Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik C
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Professor Dr. H. L. Krüskemper)

Vitamin D-Metabolite bei Patienten mit totaler Pankreatektomie

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Werner Fett

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0019

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik C
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Professor Dr. H. L. Krüskemper)

Vitamin D-Metabolite bei Patienten mit totaler Pankreatektomie

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Werner Fett

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Dr. Keck

Korreferent
gez.: Priv.-Doz. Dr. Peerenboom

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	Einleitung.....	1
2	Physiologie und Metabolismus des Vitamin D.....	5
3	Fragestellung.....	14
4.	Methodik.....	15
4.1	Versuchsaufbau.....	15
4.2	Patienten.....	15
4.3	Proteinbindungsassays für 25-OH D, 24,25-$(OH)_2$ D und 1,25-$(OH)_2$ D.....	18
4.3.1	Allgemeine Übersicht.....	18
4.3.2	Material.....	19
4.3.3	Herstellung der Bindungsproteine.....	20
4.3.4	Extraktion der Vitamin D-Metabolite aus dem Plasma.....	20
4.3.5	Trennung der Metabolite.....	21
4.3.6	Assayvorschriften.....	23
4.3.6.1	25-OH D- und 24,25-$(OH)_2$ D-Assay.....	23
4.3.6.2	1,25-$(OH)_2$ D-Assay.....	26
4.4	Bestimmung des Parathormon im Serum..	28
4.5	Bestimmung von Kalzium,Magnesium, Phosphat,der alkalischen Phosphatase und der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase.....	29
4.6	Statistische Auswertung.....	30

		Seite
5	Ergebnisse.....	31
5.1	Serumkonzentrationen von Kalzium, Magnesium, Phosphat, alkalischer Phosphatase und Parathormon.....	31
5.2	Isoenzyme der alkalischen Phosphatase	33
5.3	Vitamin D-Metabolite.....	34
5.3.1	Wiederfindung.....	34
5.3.2	Serumspiegel der Vitamin D-Metabolite 25-OH D, 24,25-$(OH)_2$ D und 1,25-$(OH)_2$D	36
6	Diskussion.....	43
7	Schlußbemerkungen.....	52
ZUSAMMENFASSUNG.....		54
DANKSAGUNG.....		56
VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN.....		57
LITERATURVERZEICHNIS.....		59

1. EINLEITUNG :

Die totale Pankreatektomie beim Menschen ist seit circa 50 Jahren bekannt. Sie wurde erstmalig 1942 von Rockey an einem Patienten mit Pankreaskopfkarzinom vorgenommen, der den Eingriff nur 15 Tage überlebte.
Im gleichen Jahr führte Priestley an der Mayo-Klinik die zweite totale Pankreatektomie an einer Patientin mit einem Inselzelladenom durch, die den Eingriff 29 Jahre überlebte und damit bewies, daß ein Leben ohne Pankreas über längeren Zeitraum möglich ist (1,2).
Soweit die Literatur zu überblicken ist, wurde bislang über mindestens 500 derartiger Operationen berichtet.
Bedingt durch die hohe postoperative Mortalitätsrate und die Schwierigkeiten bei der Stoffwechseleinstellung in der Folgezeit, wird der Indikationsbereich zur totalen Pankreatektomie sehr eng gezogen.
Als Indikationen gelten maligne Primärtumoren des Pankreas, akute, nekrotisierende Pankreatitis, Traumen, Hyperinsulinismus und chronische Pankreatitis (3).
Ein Karzinom gilt nur dann als resezierbar, wenn sich der Tumor nur innerhalb der Bauchspeicheldrüse ausbreitet und ihre Grenzen noch nicht oder nur geringfügig überschritten hat. Infiltriert die Geschwulst benachbarte Strukturen wie z.B. die Pfortader, die obere Mesenterialvene oder den Gallengang, kann im Sinne einer Palliativmaßnahme reseziert werden, eine Verlängerung der Lebenszeit wird jedoch nicht erreicht. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate nach totaler Exstirpation des Pankreas wegen eines primären Pankreaskarzinoms wird mit 1 bis 2 % angegeben (4). Über längere Überlebenszeiten als 5 Jahre ist nur vereinzelt berichtet worden (5,6,7,8).
Bei der chronisch-rezidivierenden Pankreatitis mit rezidivierenden Fieberschüben, therapieresistenten Schmerzen und bedrohlicher Verschlechterung des Allgemeinzustandes

ist eine Operationsindikation bei Versagen aller konservativer Maßnahmen gegeben.
Bei der akuten,hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis stellt die totale Pankreatektomie einen Verzweiflungseingriff dar,der in einzelnen Fällen den fatalen Verlauf aufhalten kann.
Mit der Bauchspeicheldrüse werden bei dieser Operation noch die Milz,zwei Drittel des Magens,die Gallenblase, der Zwölffingerdarm und die oberste Jejunumschlinge reseziert.Zur Vermeidung peptischer Jejunalulcera durch das Fehlen des Pankreasbikarbonats ist eine ausgedehnte Magenresektion notwendig.Die Letalität der totalen Duodenopankreatektomie wird mit 24 % angegeben (9).

Der totale Ausfall der endokrinen und exokrinen Pankreasfunktion sowie eines wichtigen Teils des oberen Verdauungstraktes macht eine lebenslange Überwachung des Stoffwechsels und eine lebenslange Substitutionstherapie erforderlich.Die diätetische und medikamentöse Einstellung fordert dem Patienten Einsicht in die Notwendigkeit der Maßnahmen und hohe Kooperationsfähigkeit ab (10).
Durch den absoluten Insulinmangel ist der pankreoprive Diabetes eher dem Typ des juvenilen Diabetes als dem Altersdiabetes zuzuordnen,zeichnet sich jedoch durch seinen relativ geringen Insulinbedarf aus.
Urban et al. (11) ermittelten bei 21 Patienten mit totaler Pankreatektomie einen täglichen Bedarf von durchschnittlich 27,8 Einheiten eines gereinigten Verzögerungsinsulins mit einer Schwankungsbreite zwischen 16 und 44 Einheiten.Wegen der erhöhten Insulinempfindlichkeit und der damit verbundenen Gefahr des hypoglykämischen Schocks - bedingt durch den gleichzeitigen Ausfall des Glukagons und der unterschiedlichen Nahrungsausnutzung infolge exokriner Pankreasinsuffizienz - muß auf eine scharfe Einstellung des Diabetes verzichtet und eine Restglukosurie zugelassen werden.
Die typischen Spätkomplikationen des Diabetes wie Angio-

pathie,Retinopathie,Nephropathie und Neuropathie treten beim pankreopriven Diabetes des Totalpankreatektomierten vergleichsweise mit dem genuinen Diabetes selten auf. Ein Zusammenhang mit der gleichzeitig verminderten Ausnutzung von Nahrungsfetten wird diskutiert (12). Insgesamt gesehen jedoch kann der Ausfall der endokrinen Pankreasfunktionen zufriedenstellend kompensiert werden.

Bei der Substituition der exokrinen Pankreasfunktionen lassen sich die fehlenden Proteinasen,Peptidasen und die Amylase hinreichend gut ersetzen.Da das Fehlen der Pankreasamylase durch die Amylase des Mundspeichels teilweise ausgeglichen wird,konnten schwere Ausfälle in der Absorption der Kohlehydrate nicht beobachtet werden. Schwierigkeiten bestehen beim Ersatz der Lipase.Da die Verdauungslipase ausschließlich vom Pankreas gebildet und sezerniert wird,ist die Fettverdauung am empfindlichsten betroffen (13).Die Effektivität der Substitutionstherapie mit Pankreasenzymen kann anhand des Stuhlfettgehaltes gut kontrolliert werden (11). Ein gesunder Erwachsener scheidet bei einer täglichen Fettaufnahme von 100 bis 150 Gramm Fett im gesammelten Stuhl von 24 Stunden weniger als 6 Gramm Fett aus.Bei schwerer Maldigestion kann die ausgeschiedene Fettmenge auf über 60 Gramm ansteigen.Liegt eine Steatorrhoe vor, läßt sich eine Verbesserung der Fettaufnahme durch Enzymsubstitution erreichen,eine völlige Normalisierung der Fettbilanz konnte nicht von allen Untersuchern registriert werden.Mit pflanzlichen Enzymen ließen sich bislang keine befriedigenden Ergebnisse in der Substitutionstherapie erzielen.Um Totalpankreatektomierte in einem guten Ernährungszustand zu halten,sind in der Regel mit größeren,individuellen Schwankungen 10 Gramm tierisches Pankreatin pro Tag notwendig.Wegen der schnelleren Auflösung im Dünndarmlumen ist der Enzymsubstitution in Granulatform der Vorzug gegenüber der Drageeform zu geben.Der Vorteil einer Diät mit mittelkettigen Triglyzeriden,deren

Resorption im Dünndarm unabhängig von der Pankreaslipase erfolgt,ist umstritten (3,5,11,14,15,16).
Die Insuffizienz der Fettverdauung birgt das Risiko von Hypovitaminosen.Dies betrifft vor allem die fettlöslichen Vitamin A,D,E und K.Durch erniedrigte Absorption von Vitamin D und Kalzium,das in Form von Kalkseifen mit dem Stuhl verloren geht,sind Hypokalzämien und osteomalazische Veränderungen vereinzelt beobachtet worden und waren nach Gabe von Vitamin D und Kalzium wieder zu beheben (5).
Da gelegentlich auch Mangelzustände der übrigen fettlöslichen Vitamine - des Vitamin K in Form von Gerinnungsstörungen mit Blutungsneigung und des Vitamin A in Form von Hyperkeratosen und Nachtblindheit - beobachtet wurden,erschien aus Sicherheitsgründen eine monatliche, parenterale Substitution der fettlöslichen Vitamine sinnvoll.

2. PHYSIOLOGIE UND METABOLISMUS DES VITAMIN D :

Mit der Erweiterung der Kenntnisse über Stoffwechsel und Wirkungsweise des Vitamin D und seiner Metabolite gilt Vitamin D heute als eine Vorstufe zu einem Hormon, das eine zentrale Rolle im Kalzium- und Phosphathaushalt spielt,und damit selbst als Präprohormon.
Vitamin D kann sowohl mit der Nahrung aufgenommen als auch in der Haut synthetisiert werden. 7-Dehydrocholesterol,das in der Haut gebildet und gespeichert werden kann (17),wandelt sich unter dem Einfluß von UV-Strahlung zu Prävitamin D_3 (18,19).Das thermolabile Prävitamin D_3 unterliegt einer langsamen,nicht-enzymatischen,thermischen Konversion zu Vitamin D_3,wobei das sich einstellende Gleichgewicht zwischen Prävitamin D_3 und Vitamin D_3 von der Hauttemperatur abhängig ist.Nach Hollick et al. (20) beträgt das Verhältnis Prävitamin D_3 / Vitamin D_3 17 : 83 bei einer Hauttemperatur von 37 C.
Durch Bindung an zirkulierendes Vitamin D-Bindungsprotein wird nahezu selektiv nur Vitamin D_3 aus der Haut entfernt und dem übrigen Körper zugeführt.Die Synthesekapazität der Haut für Vitamin D_3 übersteigt bei hinreichender UV-Strahlung die physiologisch erforderlichen Mengen,sodaß eine zusätzliche Aufnahme mit der Nahrung nicht prinzipiell erforderlich ist (22).
In den nördlichen und gemäßigten Breiten mit geringer Sonnenbestrahlung deckt die Synthese in der Haut alleine nicht den physiologischen Bedarf.Unter der Voraussetzung, daß kein negativer feedback-Mechanismus zwischen Vitamin D_3-Folgeprodukten und der Synthese in der Haut besteht, ermittelten Jones et al. (22) bei ausschließlich parenteral,Vitamin D-frei ernährten Kanadiern eine Syntheserate von 215 $\pm$ 83 IU Vitamin D_3/Tag im jährlichen Mittel.Diese Werte liegen eindeutig unter der täglich benötigten Menge von 400 IU und machen eine

zusätzliche Aufnahme mit der Nahrung erforderlich.

Die intestinale Absorption des fettlöslichen Vitamin D ist eng an die Absorption von Fetten geknüpft.
Sie erfolgt bei der Ratte nach Gabe von Vitamin D in öliger Lösung hauptsächlich in den distalen Abschnitten des Dünndarms (23,24),während nach Gabe von Vitamin D in alkoholischer Lösung das Jejunum als der Ort mit der höchsten Absorptionsrate hervortritt (25).Allerdings ist der genaue Mechanismus der Absorption aus dem Dünndarm und beim Menschen die Stelle des Absorptionsmaximum unbekannt (26).
Unbestritten ist,daß für die Absorption des fettlöslichen Vitamin D Gallensäuren notwendig sind.Ratten,bei denen die Gallenflüssigkeit künstlich abgeleitet und radioaktiv markiertes Vitamin D_3 oral verabreicht wurde, nahmen weniger als 1/10 der von gesunden Kontrolltieren absorbierten Menge an Vitamin D_3 auf (25).Gleichermaßen führt der Verlust an Gallensalzen durch Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs mittels Cholestyramin zu einer erheblichen Reduktion der Vitamin D-Aufnahme (27).Die Entwicklung einer Osteomalazie unter Cholestyramin-Therapie konnte beobachtet werden (28).Weiterhin begünstigen Fettsäuren und Monoglyceride die Aufnahme (29).
Die Vitamin D-Absorption gliedert sich in zwei Phasen : eine schnelle Aufnahme vom Darmlumen in die Mukosazellen gefolgt von einem langsamen Transfer in die Lymphflüssigkeit (25).Nach oraler Verabreichung von radioaktiv markiertem Vitamin D_3 in Pflanzenöllösung erscheint bei der Ratte der Hauptteil zwischen 4-8 Stunden nach der Zufuhr in der Lymphe,jedoch auch nach 18 Stunden konnte noch Radioaktivität nachgewiesen werden (30). 90 ± 3 % der Radioaktivität,die in der Lymphe wiedergefunden wurde,konnte mittels Ultrazentrifugation der Fraktion der Chylomikronen zugeordnet wer-

den,während nur ein geringer Teil von ca. 9 % in der Proteinfraktion erscheint (30).
Eine Veresterung,wie sie beim Cholesterin auftritt, konnte durch Rechromatografie der gesammelten Lymphe ausgeschlossen werden (30).
Beim Menschen entdeckte Thompson (31),daß 3 Stunden nach oraler Verabreichung von radioaktiv markiertem Vitamin D_3 45-100 % der Plasmaradioaktivität in der Chylomikronenfraktion zu messen ist.Die Verknüpfung des markierten Vitamin D_3 mit Plasmachylomikronen ließ diesen Forscher die Hypothese aufstellen,daß Vitamin D_3 beim Menschen - ähnlich wie schon bei der Ratte nachgewiesen (25) - größtenteils auf dem Lymphweg abtransportiert wird. Bei Steigerung der zu absorbierenden Vitamin D_2- und D_3-Dosis war bei der Ratte keine signifikante Sättigung des Absorptionsmechanismus festzustellen (25).
Absorptionsbestimmungen mittels Kanülierung des Ductus thoracicus beim Menschen bestätigten die Absorption des Vitamin D via Lymphflüssigkeit und unterstrichen die Notwendigkeit der Anwesenheit von Gallenflüssigkeit (32,33).
Insgesamt werden etwa 80 % des angebotenen markierten Vitamin D_3 in öliger Lösung aus dem Darm aufgenommen. Die Absorption des ^{3}H-Vitamin D_3 wurde berechnet aufgrund der Annahme,daß alle Radioaktivität,die nach einer Sammelperiode von 6 Tagen nicht im Stuhl nachgewiesen wurde,absorbiert sein müßte (31).Dieser Wert erscheint etwas zu niedrig,da es Belege für einen enterohepatischen Kreislauf gibt.Avioli (34) konnte nach i.v.-Gabe von markiertem Vitamin D_3 Radioaktivität in Galle und Stuhl nachweisen.Arnaud et al. (35) stützen mit ihren Forschungen die These eines enterohepatischen Kreislaufs für das 25-OH D_3.Polare Derivate von i.v. verabreichtem 25-OH D_3 erscheinen im Duodenalaspirat

in größerer Menge,als sie im Stuhl wiedergefunden werden können.Vitamin D_3,25-OH D_3,24,25-$(OH)_2$ D_3 und 1,25-$(OH)_2$ D_3 sowie unidentifizierte,höher polare Metabolite werden als Glukuronide mit der Galle ausgeschieden und können im Darm reabsorbiert werden (36,37). Ob vorher eine hydrolytische Spaltung zu freiem Vitamin D_3 resp. -Metabolit erfolgt,ist nicht bewiesen,jedoch anzunehmen,da sich nach Verabfolgung von glukuronidierten Vitamin D_3-Metaboliten die Bildung von Kalziumbindendem-Protein induzieren läßt.Diese Wirkung ist in vitro an Geweben ohne endogene Steroid-beta-Glukuronidase nicht zu beobachten (38).
Hieraus ergeben sich Hinweise für die Existenz eines Mechanismus zur Reutilisation ausgeschiedener,aktiver Vitamin D-Metabolite.

Nach Absorption aus dem Darm und Abtransport auf dem Lymphweg wird der überwiegende Anteil des Vitamin D von der Leber aufgenommen.Eine Stunde nach intravenöser Gabe von radioaktiv markiertem Vitamin D_3 sind bereits 60 - 80 % der Ausgangsmenge in der Leber gespeichert (39),wo der erste Metabolisierungsschritt,eine Hydroxylierung in Position 25 (40,41),im Endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle erfolgt (42).Diese Reaktion benötigt NADPH,molekularen Sauerstoff,Magnesium und zytosolisches Protein (42,43).Bei dieser mikrosomalen 25-Hydroxylase handelt es sich um eine vom P_{450}-System abhängige,mischfunktionelle Monooxygenase (44,45),die von Yoon und DeLuca (46) näher charakterisiert wurde. Eine weitere,jedoch nicht Vitamin D-spezifische 25-Hydroxylase mit anderen kinetischen Eigenschaften als die mikrosomale findet sich in den Mitochondrien der Leberzelle (47).Beim Menschen ist die Leber das einzige Organ,in dem 25-OH D in nennenswertem Ausmaß gebildet wird (48).

Allgemeine Übereinstimmung existiert,daß die Produktion von 25-OH D in einem weniger engen Rahmen geregelt ist verglichen mit der Produktion von 1,25-$(OH)_2$ D (s.u.). Die Experimente von Blunt (41) belegen eindeutig,daß keine lineare Beziehung zwischen der verabreichten Menge an Vitamin D_3 und der im Serum gefundenen 25-OH D_3-Konzentration besteht.Weiterhin unbestritten ist die Tatsache,daß ansteigende Dosen von appliziertem Vitamin D_3 zu einer verminderten Umsetzung von Vitamin D_3 zu 25-OH D_3 führen (49,50,51),wobei die nachweisbare Hemmung der 25-Hydroxylase durch ansteigende Konzentrationen von 25-OH D_3 in der Leber nicht alle Befunde zu erklären imstande ist.Den Experimenten von Davies (52) zufolge scheint eine erhöhte Konzentration von Vitamin D_3 in der Leber eine größere Hemmung auf die 25-Hydroxylase auszuüben als erhöhte Konzentrationen von 25-OH D_3 in der Leber.Da nun die Aktivität der 25-Hydroxylase eine Funktion ihres Substrates und ihres Produktes ist, findet sich bei chronischen Vitamin D-Mangelzuständen z.B. bedingt durch Vitamin D-Malabsorption mit vermindertem Angebot an Vitamin D sowie erniedrigten Serumspiegeln an 25-OH D eine erhöhte Konversionsrate (52).

Da 25-OH D_3 bei den im Blut zirkulierenden Konzentrationen im Gegensatz zu pharmakologischen Dosen kaum Wirkungen auf die Zielorgane aufweist (53),ist ein weiterer Metabolismus des 25-OH D_3 zur Aufrechterhaltung der Kalzium- und Phosphathomöostase erforderlich. 25-OH D wird,wie andere Vitamin D-Metabolite auch,an ein spezifisches Transportglobulin mit einem Molekulargewicht von 52 000 im Plasma gebunden (54,55).Dieses Vitamin D-bindende-Protein verfügt über eine große Kapazität für sein Substrat,sodaß ihm wahrscheinlich eine Speicher- und Schutzfunktion vor einer akuten Überschwemmung des Körpers mit Vitamin D als auch vor einem akuten Mangel zukommt (86).
In der Niere wird das 25-OH D entweder in Position 1

zum 1,25-$(OH)_2$ D oder in Position 24 zu 24,25-$(OH)_2$ D hydroxyliert.
Die renale 1α-Hydroxylase ist in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen lokalisiert (57,58) und ist ebenso wie die 25-Hydroxylase in der Leber von NADPH, Sauerstoff, Magnesium und dem P_{450}-System abhängig (59). Für die Hydroxylierung ist fernerhin ein Flavoprotein, Ferredoxin und eine Ferredoxin-Reduktase notwendig (60). Das Produkt der Hydroxylierung konnte isoliert und seine Struktur als 1α,25-$(OH)_2$ D_3 durch Massenspektroskopie eindeutig bestimmt werden (61,62).

Nephrektomie verhindert einen Anstieg des intestinalen Kalziumtransportes (62,63) und die Kalziummobilisation aus dem Knochen (64) nach Gabe von 25-OH D_3 in physiologischer Dosierung, nicht aber bei Gabe von 1,25-$(OH)_2$ D_3 (65). Nachdem von Frolick und DeLuca (66) ein weiterer Metabolismus zur Entfaltung seiner Aktivität ausgeschlossen wurde, muß das 1,25-$(OH)_2$ D_3 als der Vitamin D-Metabolit mit der höchsten biologischen Aktivität angesehen werden. Fraser und Kodicek (67) fanden bei nephrektomierten Ratten, daß diese nach Verabreichung von radioaktiv markiertem 25-OH D_3 kein markiertes 1,25-$(OH)_2$ D_3 zu bilden imstande waren und zogen daraus den Schluß, daß die Niere das einzige Organ mit der Fähigkeit zur 1α-Hydroxylierung des 25-OH D_3 ist. In neuerer Zeit mehren sich jedoch aus in vivo (68) und in vitro Versuchen Hinweise für eine extrarenale Produktion von 1,25-$(OH)_2$ D_3 in der Plazenta (69,70) und im Knochen (71,72,73).

Ein weiterer Stoffwechselweg des 25-OH D_3 ist die Hydroxylierung in Position 24 durch die 25-OH D-24-Hydroxylase, die ebenfalls wie die 1α-Hydroxylase in den Mitochondrien von Nierenzellen lokalisiert ist (74).

Durch Inkubation von Kükennierenhomogenat mit radioaktiv markiertem 25-OH D_3 konnte der Metabolit isoliert und seine Struktur als 24,25-$(OH)_2$ D_3 identifiziert werden (75).Obwohl nephrektomierte Ratten bedeutend niedrigere Serumspiegel an 24,25-$(OH)_2$ D unabhängig von der Kalzium- und Vitamin D-Aufnahme mit der Nahrung als Kontrolltiere aufweisen,sind jedoch immer noch meßbare Spiegel vorhanden (76).Das bedeutet aber,daß die Niere nicht als der einzige Ort der 24-Hydroxylierung in Frage kommt,sondern daß extrarenale Bildungsstätten existieren müssen.Diese wurden im intestinalen Gewebe (78),im Knorpel (79) und im menschlichen Knochen (71,72) gefunden.Die biologische Aktivität des 24,25-$(OH)_2$ D_3 entspricht in etwa der des 25-OH D_3 (76).

Die Produktion von 1,25-$(OH)_2$ D und von 24,25-$(OH)_2$ D unterliegt einem Regelmechanismus,von dem einzelne Komponenten bekannt sind.
Boyle et al. (80) wiesen bei Ratten einen eindeutigen feedback-Mechanismus zwischen der Serumkalziumkonzentration und der 1,25-$(OH)_2$ D_3-Synthese nach.Während bei Normokalzämie beide Vitamin D_3-Metabolite,das 1,25-$(OH)_2D_3$ und das 24,25-$(OH)_2$ D_3,in der Niere gebildet werden, stimuliert Hypokalzämie die 1,25-$(OH)_2$ D_3-Synthese und supprimiert die Bildung von 24,25-$(OH)_2$ D_3.Hohe Kalziumspiegel kehren diese Situation um.Niedriges Serumkalzium stellt einen Sekretionsreiz für die Nebenschilddrüsen dar,die vermehrt Parathormon ausschütten,das über einen unbekannten Mechanismus die Syntheserate von 1,25-$(OH)_2D_3$ steigert (81),sodaß über vermehrte Kalziumabsorption aus dem Darm und Kalziummobilisation aus dem Knochen eine normale Serumkalziumkonzentration wieder hergestellt werden kann.Ähnliches gilt für hypophosphatämische Zustände.Erniedrigung des Serumphosphates unter 8 mg/ 100 ml führt zu einer Stimulation der 1,25-$(OH)_2$ D_3-

Synthese bei gleichzeitiger Hemmung der 24,25-$(OH)_2$ D_3-Synthese unabhängig von der Anwesenheit des Parathormons (82,83).Welche Bedutung diesem direkten Regelmechanismus über Ionen in vivo zukommt,ist jedoch fraglich. Möglicherweise spielen Synthese- und Abbauprozesse der 1α-Hydroxylase eine größere Rolle für deren Regulation.

Eine Reihe weiterer Stoffe sind am Regelsystem der 1α-Hydroxylase beteiligt wie Wachstumshormon (84), Östrogene (85),zyklisches AMP (86),möglicherweise Prolaktin (87) und Prostaglandine (88).
Der nähere Mechanismus der Regulation der 25-Hydroxy-Vitamin D-24-Hydroxylase in der Niere ist weitgehend unbekannt.In vitro in Zellkulturen aus Affennieren ließ sich die Syntheserate von 24,25-$(OH)_2$ D_3 durch 1,25-$(OH)_2$ D_3 und durch erhöhte Kalziumkonzentrationen stimulieren und durch Parathormon hemmen (89).Der stimulierende Effekt des 1,25-$(OH)_2$ D_3 auf die 24-Hydroxylase läßt sich in vitro mit Hemmstoffen der Protein- und RNS-Synthese unterbinden,sodaß angenommen werden muß,daß das 1,25-$(OH)_2$ D_3 in die Synthese der 24-Hydroxylase eingreift (90).

Die wichtigsten,biologischen Wirkungen des Vitamin D und seiner Metabolite sind die Erhöhung des Kalzium- und Phosphatgehaltes der extrazellulären Flüssigkeit und die Kontrolle der Mineralisation des Knochens. Hypokalzämie führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Parathormon,das in der Niere die Rückabsorption von Phosphat hemmt,die Rückabsorption von Kalzium fördert und die Produktion von 1,25-$(OH)_2$ D_3 anregt (91,92,93,81).1,25-$(OH)_2$ D_3 erhöht am Intestinum durch Induktion der Synthese von Kalzium-bindendem-Protein den transmuralen Kalziumtransport und steigert mittels eines davon verschiedenen Mechanismus die Phosphataufnahme (94,95).Ebenso wie auf die renale

Rückabsorption von Kalzium (96) sollen einigen Untersuchungen zufolge 1,25-$(OH)_2$ D_3 und Parathormon synergistisch auf die Kalziummobilisation aus dem Knochen einwirken (95,97).Andere Untersucher belegen jedoch,daß am Knochen durch 1,25-$(OH)_2$ D_3 der Parathormonrezeptor desensitiviert wird,sodaß auf Gabe von Parathormon das zelluläre cAMP als second messenger nicht mehr ansteigt (98,99) und in vitro eine verminderte Freisetzung von Kalzium resultiert (100).

3. FRAGESTELLUNG :

Bislang liegen keine Untersuchungen des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels sowie Messungen der einzelnen Vitamin D-Metabolite bei Pankreatektomierten vor. Osteomalazie jedoch,bedingt durch Störungen der Vitamin D-Absorption im Gefolge von Fettmalabsorption,ist mehrfach beobachtet worden.Ihre möglicherweise häufigste Ursache in Europa wird in der Maldigestion nach Billroth-II-Operationen gesehen (101,102,103).
Durch eine Erhebung des Vitamin D-Status im Serum sowie durch Messung wichtiger Parameter des Kalziumstoffwechsels im Serum (Kalzium,Phosphat,Magnesium, Aktivität der Alkalischen Phosphatase,Isoenzyme der Alkalischen Phosphatase,Parathormon) versuchen wir Hinweise zu erhalten,ob sich bei Pankreatektomierten trotz Ersatz der fehlenden Pankreasenzyme Vitamin D-Mangelzustände entwickeln,auf die das endokrine Regelsystem des Vitamin D möglicherweise kompensatorisch zu reagieren imstande ist.
Nicht zuletzt erwarten wir von dieser Untersuchung, objektive Aussagen über die Berechtigung einer prophylaktischen Substitutionstherapie mit Vitamin D bei Pankreatektomierten machen zu können.

4. METHODIK :

4.1. Versuchsaufbau

Bei pankreatektomierten Patienten wurde Blut abgenommen zur Bestimmung folgender Parameter :

25-OH D , 24,25-$(OH)_2$ D , 1,25-$(OH)_2$ D ,

Kalzium, Phosphat und Magnesium im Serum ,

Alkalische Phosphatase und Isoenzyme der alkalischen Phosphatase ,

Parathormon (intaktes PTH und C-terminale Fragmente).

Eine genaue Anamnese hinsichtlicher osteomalazischer Beschwerden, Verdauungsproblemen, intensiver Sonnenbestrahlung und Medikamenteneinnahme mit besonderem Augenmerk auf Vitamin D-Substitution wurde erstellt.
Die laborchemischen Methoden werden im Folgenden einzeln beschrieben.

4.2. Patienten

Wir untersuchten 13 Patienten mit totaler Pankreatektomie und 2 Patienten mit Pankreasteilresektion.
Es handelt sich um 11 Männer und 4 Frauen im Alter zwischen 34 und 66 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 47,1 Jahre.
12 Patienten waren wegen einer chronisch-rezidivierenden Pankreatitis, 2 wegen eines Pankreaskarzinoms und einer wegen eines Papillenkarzinoms operiert worden. Bis zum Zeitpunkt der Untersuchung betrug die längste Überlebenszeit 8 Jahre. Die postoperative Therapie wurde nicht einheitlich durchgeführt, jedoch wurden alle Patienten mit Pankreasenzymen in Form von Pankreon-Granulat substituiert (1 Teelöffel entspricht etwa 980 mg Pankreatin). Die durchschnittliche , tägliche Substitution

mit Pankreatin betrug etwa 10 Gramm.
Insulin benötigten 7 von 13 Patienten, eine Substitution der fettlöslichen Vitamin A, D, E und K erhielten 3 von 13 Patienten. Ihnen wurden monatlich parenteral 100 000 IE Vitamin A, 10 000 IE Vitamin D_3, 100 mg Vitamin E und 10 mg Vitamin K verabreicht.
An Beschwerden gaben die Patienten ausgeprägte Kreuzschmerzen, wie sie für eine Osteomalazie typisch sind, Bauchschmerzen, Gallenbeschwerden, Schmerzen in den Kniegelenken und Waden sowie Knöchelschmerzen an.
4 von 13 Patienten hatten keine Beschwerden.
Die allgemeinen Daten der Patienten mit Pankreatektomie sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 : Allgemeine Daten der Patienten mit Pankreatektomie.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Operation	Therapie	Beschwerden
1	männlich	?	chron. Pankreatitis	?	?	?
2	"	?	"	1974	?	?
3	weiblich	45 J.	"	4/77	Pankreon, Multivitamin Lappe	Bauchschmerzen Cholecystitiden
4	"	66 J.	Pankreas-CA	3/77	Pankreon, Insulin	Schmerzen in den Rückenwirbeln
5	männlich	46 J.	chron. Pankreatitis	5/76	Pankreon 40E Komb Insulin	Oberbauchbeschwerden nach dem Essen, Wadenkrampfe
6	"	48 J.	"	3/72	Pankreon	starke Kreuzschmerzen, Knochel- und Wadenschmerzen
7	"	49 J.	"	1/76	Pankreon, Adek Monotard/actrapid	Gallenwegsbeschwerden
8	"	46 J.	"	2/78	Pankreon, Adek Insulin Depot	Schmerzen in beiden Kniegelenken
9	"	34 J.	"	12/73 Teilresektion	Pankreon	keine
10	"	42 J.	Pankreaskopf-CA	10/79	Pankreon	keine
11	"	57 J.	chron Pankreatitis	8/79	Pankreon 26 E Komb Insulin	rezidivierende Fieberschube
12	weiblich	49 J.	"	10/77 Teilresektion	Pankreon	keine
13	"	50 J.	Papillen-CA	9/79	Pankreon	keine
14	männlich	45 J.	chron. Pankreatitis	11/79	Pankreon 30 E Komb. Insulin	Durchfälle Gewichtsabnahme
15	"	35 J.	"	2/76	Pankreon 56E Komb. Insulin	Kreuzschmerzen Fettstühle

4.3. Proteinbindungsassays für 25-OH D , $24,25\text{-(OH)}_2$ D und $1,25\text{-(OH)}_2$ D

4.3.1 Allgemeine Übersicht

Proteinbindungsassays als quantitative Bestimmungsmethode für die drei wichtigsten Vitamin D-Metabolite sind seit längerem im Gebrauch (104,105,106,107,108, 109).
Die Bestimmung erfolgte nach der von Keck (110) beschriebenen Methode,die sich an das Verfahren von Lambert et al. (108) anlehnt.
Aus einer einzigen 6 ml Plasmaprobe werden die Metabolite mit einer Mischung von Methanol/Methylenchlorid extrahiert und anschließend das 25-OH D von dem $24,25\text{-(OH)}_2$ D- und dem $1,25\text{-(OH)}_2$ D-Metaboliten durch Gelchromatografie auf einer LH-20 Säule getrennt und in einem zweiten Chromatografieschritt gereinigt.
Mit Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC) kann eine gute Trennung der dihydroxylierten Metabolite erreicht werden.Die nun getrennten Metabolite werden in drei kompetetiven Proteinbindungsassays bestimmt.
Das Prinzip des Proteinbindungsassays basiert auf der Konkurrenz von radioaktiv markiertem und unmarkiertem Vitamin D-Metabolit um eine Rezeptorstelle an einem Bindungsprotein.
Das Bindungsprotein für den 25-OH D- und den $24,25\text{-(OH)}_2$ D-Assay wurde nach der Vorschrift von Haddad und Chyu (104) aus Nieren von Vitamin D-arm ernährten Ratten gewonnen,das Bindungsprotein für den $1,25\text{-(OH)}_2$ D-Assay wurde gemäß der Anleitung von Lambert et al. (108) hergestellt und stammt aus der Dünndarmmukosa von Vitamin D-arm ernährten Küken.

Bindungsprotein wird mit markiertem Vitamin D und mit

verschiedenen Konzentrationen unmarkierter Vitamin D-Derivate zur Erstellung einer Standardkurve inkubiert. Nachdem sich ein Gleichgewicht der um die Rezeptorstellen konkurrierenden Metabolite eingestellt hat, werden die freien Metabolite von dem Metabolit-Bindungsprotein-Komplex mittels Charcoal getrennt. Die Radioaktivität des Metabolit-Bindungsprotein-Komplexes wird gemessen und sein Wert gegenüber der bekannten Konzentration an Vitamin D-Metabolit in einem Koordinatensystem aufgetragen. Die Verbindung dieser Koordinaten ergibt die Standardkurve, aus der die Konzentrationen der Vitamin D-Metabolite aus den Patientenseren interpoliert werden können.

4.3.2 Material

(1,2(n)-^{3}H)Cholecalciferol (Lot.Nr.998-180, NEN, Boston);
(1,2(n)-^{3}H)Cholesterin (Lot.Nr.1009-094, NEN, Boston);
25-Hydroxy-(23,24(n)-^{3}H) cholecalciferol (Code TRK. 558, Batch 8);
24,25-Dihydroxy-(23,24(n)-^{3}H) cholecalciferol (Code TRK.616, Batch BA 1);
1,25-Dihydroxy-(23,24(n)-^{3}H) cholecalciferol (Code TRK.558, Batch A8).
Alle radioaktiven Vitamin D-Metabolite sind käuflich erhältlich bei der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig. Sämtliche radioaktiven Metabolite wurden über eine wassergekühlte LH 20-Säule (50 cm, Durchmesser 1,5 cm, Sephadex LH 20, Firma Pharmacia Chemicals Fine, Uppsala, Schweden) gereinigt. Als Laufmittel diente ein Gemisch von n-Hexan/Chloroform/Methanol 9:1:1 (v:v:v). Der zweite Reinigungsschritt erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatografie (Laboratory Data Control, Florida, USA; Flußrate 1ml/min; Laufmittel Dichlormethan/Methanol 98:2 (v:v); Gel LiChrosob SI 100, 10 µm). Organische Lösungsmittel und das Chromatografiegel wurden von

der Firma Merck,Darmstadt bezogen.Der verwendete Puffer bestand aus 0,05 mol/l Tris-HCl,0,15 mol/l KCl (Merck,Darmstadt) und 12 mmol/l Thioglycerin (Fluka AG,Buchs,Schweiz),pH 7,4 bei 23 °C.

4.3.3 Herstellung der Bindungsproteine

Die Bindungsproteine zur Bestimmung des 25-OH D und des 24,25-$(OH)_2$ D wurden gemäß der Vorschrift von Haddad und Chyu (104) aus Nieren von rachitischen Ratten gewonnen,sofort nach ihrer Aufarbeitung tiefgefroren und unter Stickstoff bei -70 °C gelagert.Vor dem Einsatz in den Assay wurden die Bindungsproteine mit Tris-Puffer im Verhältnis 1:40 verdünnt.
Das Bindungsprotein für den 1,25-$(OH)_2$ D-Assay wurde in Anlehnung an die von Lambert et al. (108) beschriebene Methode aus der Darmmukosa osteomalazischer Küken gewonnen.Die Küken wurden 4-5 Wochen lang nach ihrem Schlüpftermin bei 32 °C unter Rotlicht, Vitamin D-armer Kost und entmineralisiertem Wasser ad libitum bis zu ihrer Tötung gehalten.

4.3.4. Extraktion der Vitamin D-Metabolite aus dem Plasma

Zur Bestimmung der Recovery werden zu jeder Probe bestehend aus 6 ml Plasma radioaktiv markierte Vitamin D-Metabolite hinzugegeben (1500 cpm 25-OH D_3,spezifische Aktivität 4,07 PBq/mol; 1000 cpm 24,25-$(OH)_2$ D_3, spezif.Aktivität 3,05 PBq/mol; 1500 cpm 1,25-$(OH)_2$ D_3, spezif.Aktivität 4,07 PBq/mol).
Die zweigeteilten Proben werden in der Kälte mit dem 3-fachen ihres Volumens eines kalten Gemisches aus $CH_3OH/CHCl_2$ 2:1 (v:v) geschüttelt,nach weiterer Zugabe von Dichlormethan nochmals geschüttelt und bei 4 °C und 1400 g 15 min lang zentrifugiert.Die zweite

Extraktion wird mit 2 Volumen Dichlormethan durchgeführt.
Die Extrakte der zweigeteilten Proben werden vereinigt, mit gleichem Volumen Phosphatpuffer (0,05 mol/l,pH 8,5) gewaschen und mittels eines Rotationsverdampfers im Wasserstrahlvakuum zur Trockne gebracht.

4.3.5. Trennung der Metabolite

In dem ersten Chromatografieschritt wird die Probe über eine durch radioaktive Metabolite kalibrierte LH 20-Säule (Sephadex LH 20, 0,9 cm x 10 cm)gegeben. Als Laufmittel dient ein Gemisch aus n-Hexan/Chloroform/Methanol 9:1:1 (v:v:v).Dabei kann die Fraktion des 25-OH D von den Fraktionen der übrigen Metabolite gut abgetrennt werden.In einem zweiten Chromatografieschritt werden die Proben mit einem unpolaren Laufmittel n-Hexan/Chloroform 1:1 (v:v) zur Reinigung von Assay-störenden Lipoproteinen ebenfalls über eine LH 20-Säule gegeben.Über einer HPLC-Säule (LiChrosorb SI 100,10 um,Laufmittel Dichlormethan/Methanol 98:2 (v:v),Flußrate 1 ml/min,Säulendruck 86 psi) erfolgt eine letzte Reinigung und die Trennung der dihydroxylierten Metabolite.Die Elutionsprofile zweier LH 20-Säulen und der HPLC sind in Abbildung 1 dargestellt. Die entsprechenden Fraktionen der HPLC werden mit Stickstoff eingedampft und können nun in den Assay eingesetzt werden.

Abbildung 1.1. : Elutionsprofil markierter Vitamin D_3-Metabolite auf der 1.LH 20-Säule (Laufmittel : n-Hexan/Chloroform/Methanol 9:1:1 (v:v:v))

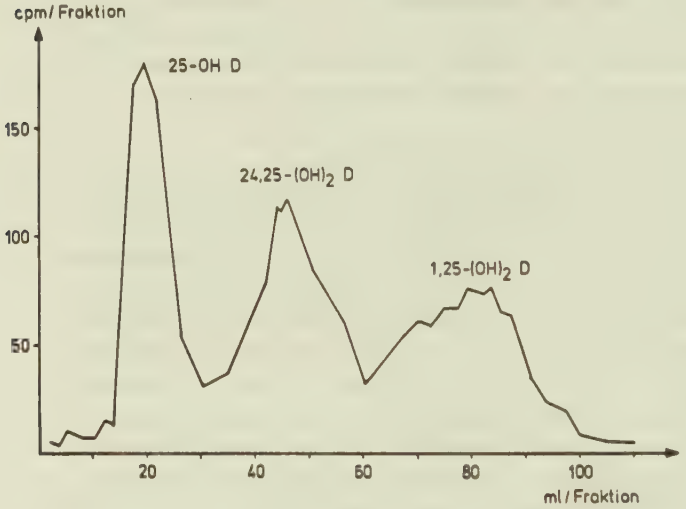


Abbildung 1.2. : Elutionsprofil markierter Vitamin D_3-Metabolite auf der 2.LH 20-Säule (Laufmittel : n-Hexan/Chloroform 1:1 (v:v))

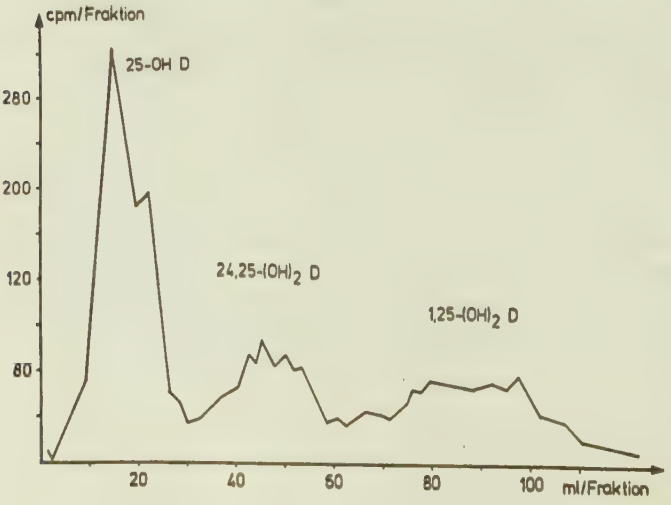
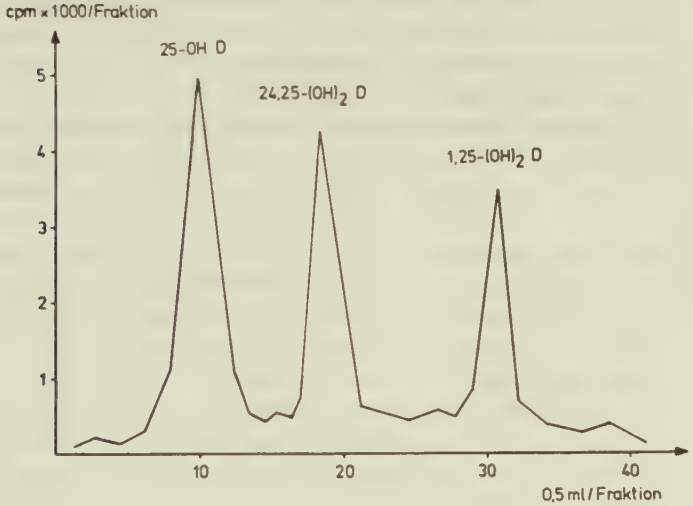


Abbildung 1.3. : Elutionsprofil markierter Vitamin D_3-Metabolite auf der HPLC (Laufmittel : Dichlormethan/ Methanol 98:2 (v:v))



4.3.6. Assayvorschriften

4.3.6.1. 25-OH D- und 24,25-$(OH)_2$ D-Assay

Der das 25-OH D enthaltende Rückstand wird in 1600 µl CH_2Cl_2/CH_3OH 98:2 (v:v) aufgenommen und ein Aliquot von 500 µl zur Berechnung der Recovery in einem Liquid Scintillation Spectrometer (Tricarb,Packard,Warrenville,USA) gezählt. 2 Proben zu je 250 µl werden unter Stickstoff eingedampft,in 60 µl Äthanol aufgenommen, wovon 50 µl in den Assay eingesetzt werden.

Der das 24,25-$(OH)_2$ D enthaltende Rückstand wird in 600 µl CH_2Cl_2/CH_3OH 98:2 (v:v) resuspendiert. 50 µl werden zur Ermittlung der Recovery gezählt und ebenfalls zwei Proben zu jeweils 250 µl wie oben behandelt und zur Doppelbestimmung in den Assay eingesetzt. Die unterschiedlichen Volumenfaktoren neben den unterschiedlichen Recovery-Werten wurden bei der endgültigen Berechnung berücksichtigt.
Das weitere Vorgehen wird für beide Assays nach einer einheitlichen Vorschrift durchgeführt.
Es wird in 4 Proben die spezifische Bindung des Rezeptors und in weiteren 4 Proben die unspezifische Bindung der Assayreagenzien bestimmt.Für die Standardkurve,die einen Meßbereich von 0,15 ng/Röhrchen bis 20 ng/Röhrchen einschließt,werden Verdünnungsreihen von ursprünglich kristallinen,unmarkierten Vitamin D-Derivaten benötigt.Als Tracer fungieren jeweils 10 000 cpm des radioaktiven Vitamin D-Metaboliten gelöst in 50 µl Äthanol,die in jedem Röhrchen vorgelegt und - ausgenommen die Röhrchen der spezifischen und unspezifischen Bindung - mit Stickstoff eingedampft werden,um den Äthanolgehalt im Assayansatz möglichst gering zu halten.Der Tracer wird nun mit den in 50 µl Äthanol gelösten Standards und Proben versetzt.Den Röhrchen für Standardkurve,Proben und spezifische Bindung werden 1 ml in Tris-HCl-Puffer gelöstes Bindungsprotein,den Röhrchen für die unspezifische Bindung 1 ml Tris-HCl-Puffer zugegeben.
Nach zweistündiger Inkubation bei 25 °C folgt die Trennphase mit jeweils 0,5 ml einer 1% igen Aktivkohle (Norit A,Serva,Heidelberg) in Assaypuffer.Die Kohle wird in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert (4 °C,1400 g,20 min) und 1 ml des Überstandes wird abpipettiert und im Szintillationszähler gemessen. Durch Auftragen der gemessenen Radioaktivität gegen

bekannten Vitamin D-Standards in einem Koordinatensystem, erhält man die Standardkurve, aus der die zu ermittelnden Werte der unbekannten Proben interpoliert werden können. Abbildung 2.1. zeigt die Standardkurve zur Bestimmung des 25-OH D und Abb. 2.2. die Standardkurve zur Bestimmung des 24,25-$(OH)_2$ D.
Die zur Berechnung der Recovery zugesetzten, markierten Metabolite werden rechnerisch nicht berücksichtigt, da sie bei einer Recovery von 50 % nur 1 % im 25-OH D-Assay und 2 % im 24,25-$(OH)_2$ D-Assay gegenüber dem Tracer ausmachen.

Abbildung 2.1. : Standardkurve zur Bestimmung des 25-OH D

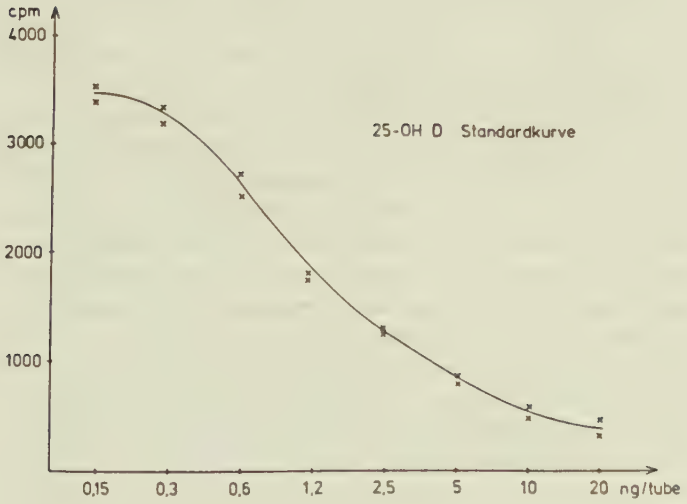
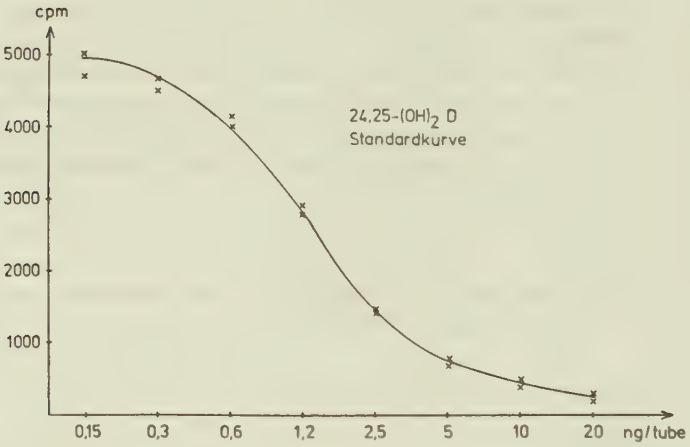


Abbildung 2.2. : Standardkurve zur Bestimmung des $24,25\text{-}(OH)_2$ D



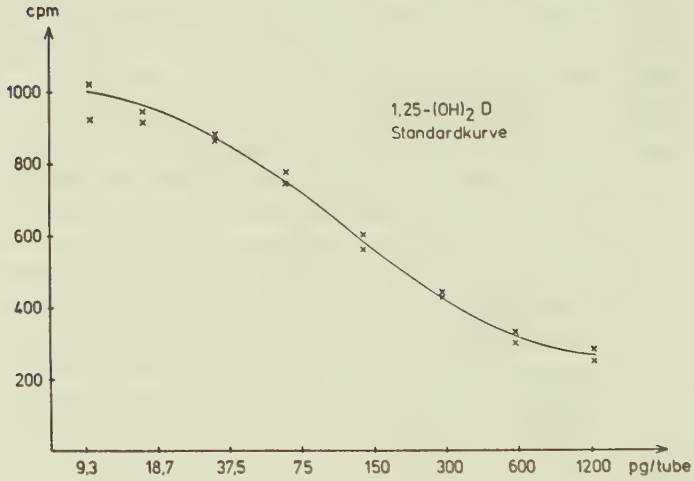
4.3.6.2. $1,25\text{-}(OH)_2$ D-Assay

Der das $1,25\text{-}(OH)_2$ D enthaltende Rückstand wird in 600 µl CH_2Cl_2/CH_3OH 98:2 (v:v) resuspendiert und 50 µl der Lösung werden zur Bestimmung der Recovery entnommen. Der Rest wird unter Stickstoff eingedampft und in 30 µl Äthanol aufgenommen. 25 µl davon gelangen in den Assay, sodaß auf Doppelbestimmungen verzichtet werden muß. Als Tracer werden 5 000 cpm markiertes $1,25\text{-}(OH)_2$ D_3 in 25 µl Äthanol eingesetzt. Zur Korrektur der Recoverycounts dürfen den Serumproben bei einer Recovery von durchschnittlich 50 % nur 4 500 cpm des markierten Metaboliten zugeführt werden. In allen Röhrchen mit Ausnahme derer, in denen die spezi-

fische Bindung und die unspezifische Bindung gemessen werden soll, wird die Tracerlösung unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wird entweder mit den 25 µl Probenlösung oder mit dem jeweiligen Standard in 25 µl Äthanol aufgenommen. Für die Standardkurve, die einen Meßbereich von 9,3 pg/Ansatz bis 1200 pg/Ansatz erfaßt, werden Verdünnungsreihen von ursprünglich kristallinem, unmarkiertem 1,25-$(OH)_2$ D_3 benötigt.

Nach Zugabe von 500 µl Rezeptorlösung bzw. Tris-HCl-Puffer wird der Assay 2 Stunden im Schüttelbad bei 25 °C inkubiert, mit 250 µl präparierter Charcoal-Lösung versetzt, 30 min stehen gelassen und dann zentrifugiert (4 °C, 15 min, 1400 g). In 500 µl des Überstandes wird die Radioaktivität gezählt.
Für diesen Assay muß eine speziell präparierte Kohlenlösung verwendet werden. Eine 1% ige Charcoal-Lösung im Assaypuffer wird mit Vitamin D-armen Humanplasma im Verhältnis 1:20 vermischt, 12 Stunden bei 4 °C gerührt und anschließend zentrifugiert (4 °C, 15 min, 1400 g). Mit Assaypuffer wird das Zentrifugat bis zu einer Endkonzentration von 5 % verdünnt. Die Standardkurve erhält man wie bei den anderen beiden Assays beschrieben. Abbildung 2.3. zeigt die Standardkurve zur Bestimmung des 1,25-$(OH)_2$ D.

Abbildung 2.3. : Standardkurve zur Bestimmung des $1,25\text{-}(OH)_2$ D



4.4. Bestimmung des Parathormon im Serum

Das Parathormon wurde mittels eines Radioimmunoassays gemessen, der komplett mit allen notwendigen Reagentien vom Institut National des Radioelements, Fleurus, Belgien vertrieben wird (IRE PTH-RIA 100/EO 182-1). Der IRE-RIA-Kit erlaubt einen empfindlichen und spezifischen Nachweis von PTH in kleinen Serumproben.

Eine definierte des PTH-Standards oder des körpereigenen PTH aus der Serumprobe konkurriert mit zugefügtem, radioaktiv markiertem PTH (Tracer) um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen an einem Antikörper, der vom Kaninchen gewonnen wird und sich vor-

wiegend gegen das C-terminale Ende des PTH-Moleküls, aber auch gegen intaktes PTH richtet. Angriffspunkt ist hauptsächlich eine Sequenz, die zwischen den Aminosäuren 34-84 gelegen ist.
Nach 3 tägiger Vorinkubation der Probe mit Antiserum bei 4 °C und nachfolgender Hauptinkubation mit dem Tracer ebenfalls für 3 Tage bei gleicher Temperatur, bildet sich ein Antigen-Antikörperkomplex. Daran schließt sich eine spezifische Ausfällung des Antigen-Antikörperkomplexes durch eine weitere 5 stündige Inkubation unter Rotieren bei Raumtemperatur mit einem an aktivierte Zellulose gekoppelten Gamma-Globulin-Antikörper an. Nach Zentrifugation wird die Radioaktivität des Präzipitates in einem Gamma-Zähler gemessen. Trägt man die gemessene Radioaktivität gegen die bekannten Mengen an PTH der Standardreihe in einem Koordinatensystem auf, so ergibt die Verbindung der einzelnen Punkte die Standardkurve, aus der die Konzentrationen von PTH in den Patientenproben interpoliert werden können.

4.5. Bestimmung von Kalzium, Magnesium, Phosphat, der alkalischen Phosphatase und der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase

Die Messungen erfolgten nach den üblichen klinisch-chemischen Methoden :

Kalzium und Magnesium atomabsorptionsphotometrisch (Perkin Elmer 300) ,

Phosphat colorimetrisch als Phosphormolybdat ,

die alkalische Phosphatase nach der optimierten Standardmethode (Boehringer) ,
die Isoenzyme der alkalischen Phosphatase wurden durch eine Agar-Gel-Disk-Elektrophorese aufgetrennt.

4.6. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der Einzelwerte ($\bar{x} \pm s$) herangezogen.
Zur Signifikanzprüfung wurde der Student-t-Test für unverbundene Stichproben verwandt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0{,}05$ festgelegt d.h. die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art (alpha) ist kleiner als 5 %.
Die Signifikanzschranken wurden den Geigy-Tabellen entnommen.
Zur Kennzeichnung linearer Abhängigkeiten zweier Merkmale wurde die Regressionsgerade und der empirische Korrelationskoeffizient r errechnet.

5. ERGEBNISSE :

5.1. Serumkonzentrationen von Kalzium, Magnesium, Phosphat, alkalischer Phosphatase und Parathormon bei 15 pankreatektomierten Patienten

Bei 15 pankreatektomierten Patienten im Alter zwischen 34 und 66 Jahren, die alle mit Pankreasenzymen substituiert wurden, fand sich eine mittlere Konzentration von Kalzium i.S. von 2,20 $\pm$ 0,25 mmol/l ($\bar{x} \pm s$) bei einem Normalbereich von 2,05 - 2,60 mmol/l. Diese Werte weichen nicht signifikant von dem Normwert ab. Zwei Patienten lagen mit ihren Kalziumspiegeln deutlich unter der Norm (1,65 und 1,85 mmol/l), einer lag grenzwertig zur Hypokalzämie (2,05 mmol/l) und ein weiterer an der oberen Grenze (2,60 mmol/l). Die Übrigen Werte lagen im Normbereich.

Die mittlere Magnesiumkonzentration von 0,76 $\pm$ 0,12 mmol/l unterscheidet sich nicht signifikant von dem Normbereich zwischen 0,65 - 1,05 mmol/l. Lediglich zwei Patienten wiesen eine leichte Erniedrigung auf (0,63 und 0,64 mmol/l).

Der Serumphosphatspiegel wies im statistischen Mittel ebenfalls keine signifikante Veränderung gegenüber dem Normbereich auf. Bei einer mittleren Phosphatkonzentration von 1,15 $\pm$ 0,33 mmol/l (Normbereich: 0,90 - 1,45 mmol/l) waren zwei Werte unter der Norm (0,87 und 0,88 mmol/l), zwei weitere nach unten grenzwertig (0,90 und 0,91 mmol/l), einer nach oben grenzwertig (1,45 mmol/l) und zwei deutlich erhöht (1,64 und 1,62 mmol/l).

Bei der Aktivität der alkalischen Phosphatase war im Mittel keine signifikante Veränderung festzustellen. Sie betrug im Durchschnitt 102 $\pm$ 44 U/l bei einem

Normbereich zwischen 40 - 190 U/l.Bei zwei Patienten wurde eine verminderte Aktivität gemessen mit jeweils 39 U/l,zwei Werte waren mit 924 U/l und 240 U/l deutlich erhöht.

Insgesamt liegt bei den Mittelwerten der vorherigen Serumparameter keine signifikante Abweichung des Kollektivs von den Normwerten vor.Dadurch sind keine einheitlichen Aussagen zu den Befunden insgesamt zu machen,sondern nur einzelne Befundkonstellationen einer Interpretation zugänglich.

Die Werte für das Parathormon liegen bei einem Durchschnitt von 740 $\pm$ 125 pg/ml insgesamt im oberen Normbereich,der von 250 - 800 pg/ml definiert ist.Bei 5 von 15 Patienten lag eine Erhöhung vor (810,830, 860,880 und 940 pg/ml).

In Tabelle 2 sind die Serumparameter der 15 pankreatektomierten Patienten aufgelistet.Die Patienten sind nach zunehmender Anzahl pathologischer Parameter geordnet.Pathologische Werte sowie solche,die gerade noch grenzwertig sind,sind gekennzeichnet.

3 Patienten sind mit ihren Serumwerten vollständig ausgeglichen,bei 5 von 15 ist ein Wert,bei weiteren 5 sind zwei und bei den letzten beiden 3 bzw. 4 Werte pathologisch verändert oder gerade noch grenzwertig. Die letzten beiden Patienten zeigen mit erniedrigtem Serumkalzium, -phosphat und magnesium sowie den sekundär erhöhten PTH-Werten die typische Konstellation wie bei einem sekundären Hyperparathyreoidismus,bzw. einer Osteomalazie.Da bei keinem der Patienten eine Niereninsuffizienz vorlag,ist eine renale Genese unwahrscheinlich.

Tabelle 2 : Serumparameter der pankreatektomierten Patienten. Elektrolyte in mmol/l, AP in U/l, PTH-Werte in pg/ml

Patient	Calcium 2,05-2,60	Phosphat 0,90-1,45	Magnesium 0,65-1,05	AP 40-190	PTH 250-800
1	2,20	0,93	0,73	84	680
2	2,30	1,15	0,73	134	770
15	2,50	1,10	0,68	79	580
3	2,35	0,90	1,01	153	770
10	2,35	1,45	0,66	79	590
6	2,15	0,87	0,82	140	630
7	2,35	1,04	0,87	924	660
12	1,65	1,24	0,77	90	760
13	2,25	1,62	0,70	111	860
5	2,25	0,91	0,69	240	740
8	2,60	1,13	0,79	39	600
9	2,10	1,37	0,63	69	810
14	2,10	1,64	0,87	164	830
4	1,85	0,88	0,86	147	880
11	2,05	0,98	0,64	39	940
$\bar{x} \pm s$	2,20 ± 0,25	1,15 ± 0,33	0,76 ± 0,12	102 ± 44	740 ± 125

5.2. Isoenzyme der alkalischen Phosphatase

Phosphatesterspaltende Enzyme mit pH-Optimum im alkalischen Bereich finden sich in zahlreichen Geweben. Die höchsten Aktivitäten kommen in der Leber, im Knochen, in der Dünndarmschleimhaut und in den Gallenwegsepithelien vor.
Da die gesamtalkalische Phosphatase keinen Rückschluß auf den Ursprungsort zuläßt, wurde sie durch eine Agar-Gel-Disk-Elektrophorese in ihre einzelnen Isoenzyme aufgetrennt.

Die deutliche Erhöhung der gesamtalkalischen Phosphatasen der Patienten 7 und 5 beruht ausschließlich auf einer Erhöhung des Leber- und Galle-spezifischen Isoenzymms.Dieser Befund deutet auf eine Cholestase hin,die gut mit den geklagten Beschwerden der Patienten (s.Tab.1) in Einklang gebracht werden kann.
Weiterhin schien es sinnvoll,bei den Patienten mit klinischem Hinweis auf Osteomalazie eine Auftrennung der alkalischen Phosphatase in die Isoenzyme vorzunehmen.
Eine Erhöhung des knochenspezifischen Isoenzyms als Ausdruck einer gesteigerten Osteoblastenaktivität fanden wir bei den Patienten 4 und 6.Die geklagten Beschwerden wie Rücken- bzw. Kreuzschmerzen (s.Tab 1) passen auch hier gut zu den veränderten Isoenzymen.
Abbildung 3 zeigt die charakteristisch veränderten Spektren der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase bei Pat. 7 mit Cholestase und Patient 4 mit Osteomalazie im Agar-Gel-Disk-Elektrophorese-Diagramm.

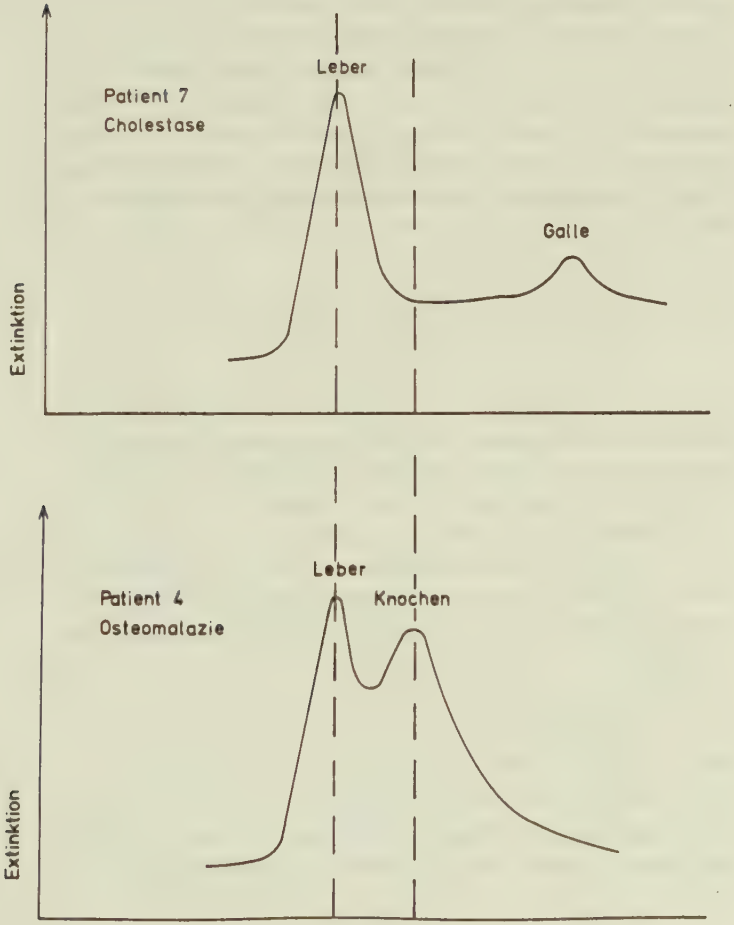
5.3. Ergebnisse der Bestimmung der Vitamin D-Metabolite bei Pankreatektomierten

5.3.1. Wiederfindung

Vor dem Einsatz der gereinigten Proben in den Proteinbindungsassay wurde eine Aliquot zur Messung des Verlustes an vorher zugesetzten,radioaktiv markierten Vitamin D_3-Metaboliten entnommen.Nach 4 Reinigungs- und Separationsschritten konnten in den einzelnen Assays folgende Prozentzahlen der Ausgangsradioaktivität wiedergefunden werden :

46 ± 8 % ($\bar{x} \pm s$) mit einer Schwankungsbreite von 30-58 % für das 25-OH D_3,

Abbildung 3. : Verteilung der Isoenzyme der alkalischen Serumphosphatase bei Patient 7 mit Cholestase und Patient 4 mit Osteomalazie



51 $\pm$ 7 % mit einer Schwankungsbreite von 32-61 %
für das 24,25-$(OH)_2$ D_3 und
41 $\pm$ 7 % mit einer Schwankungsbreite von 25-51 %
1,25-$(OH)_2$ D_3.

Diese Werte stehen in annähernder Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Keck (110),der bei identischem Vorgehen eine Recovery von 48 % für das 25-OH D_3,von 55 % für das 24,25-$(OH)_2$ D_3 und von 52 % für das 1,25-$(OH)_2$ D_3 maß.Eine deutliche Differenz kann somit nur für das 1,25-$(OH)_2$ D_3 beobachtet werden.
Ausgehend von der Annahme,daß der Verlust von Vitamin D-Metaboliten in den Proben prozentual dem Verlust zugesetzter,radioaktiver Substanz gleich ist,wurde jede Probe entsprechend ihrem eigenen Recoverywert auf 100 % hochgerechnet.

5.3.2. Serumspiegel der Vitamin D-Metabolite 25-OH D, 24,25-$(OH)_2$ D und 1,25-$(OH)_2$ D

Die Werte für das 25-OH D sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen,die 24,25-$(OH)_2$ D-Werte Mittelwerte aus Doppelbestimmungen,während die 1,25-$(OH)_2$ D-Werte nur Einfachbestimmungen sind und daher nur mit Vorsicht interpretiert werden sollten.
Die Serumkonzentrationen der einzelnen Vitamin D-Metabolite der einzelnen Patienten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt und nach steigenden 25-OH D-Werten geordnet.
Als Bezugswerte gelten :

15 $\pm$ 5 ng/ml 25-OH D
2,5 $\pm$ 1 ng/ml 24,25-$(OH)_2$ D
53 $\pm$ 11 pg/ml 1,25-$(OH)_2$ D

Diese angegebenen Bezugswerte wurden von Keck (111) 1982 aus 40 Proben unselektierten,gepoolten Serums verteilt über das ganze Jahr ermittelt.Sie unterscheiden

sich von dessen 1980 gemessenen Werten (110) durch Modifizierung des Verfahrens um den Faktor +1,18 für das 25-OH D,+1,67 für das 24,25-$(OH)_2$ D und 2,05 für das 1,25-$(OH)_2$ D.Da die vorliegenden Meßergebnisse der Vitamin D-Metabolite bei pankreatektomierten Patienten auf dem 1980 angewendeten Verfahren beruhen,erschien es ratsam,sie mit den oben angegebenen Faktoren zu korrigieren,um sie den exakteren Bezugswerten vergleichbar zu machen.

Der Mittelwert für das 25-OH D betrug bei 15 Pankreatektomierten 7,2 $\pm$ 6,2 ng/ml ($\bar{x} \pm s$) bei einem hohen Variationskoeffizienten von 85,6 %.Insgesamt liegt dieser Wert mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ deutlich zu niedrig.

Der Mittelwert für das 24,25-$(OH)_2$ D liegt mit 0,41 $\pm$ 0,23 ng/ml ebenfalls signifikant ($p < 0,01$) unter dem Wert der Vergleichsgruppe.Der Variationskoeffizient beträgt 55,6 %.

Zur statistischen Auswertung der Werte für das 1,25-$(OH)_2$ D können nur 13 Daten herangezogen werden, da bei zwei Proben die Konzentrationen nicht meßbar waren und so statistisch nicht berücksichtigt werden können.
Auch beim 1,25-$(OH)_2$ D fand sich ein signifikant ($p < 0,01$) zu niedriger Mittelwert mit 37 $\pm$ 22,5 pg/ml bei einem Variationskoeffizienten von 60,3 %.

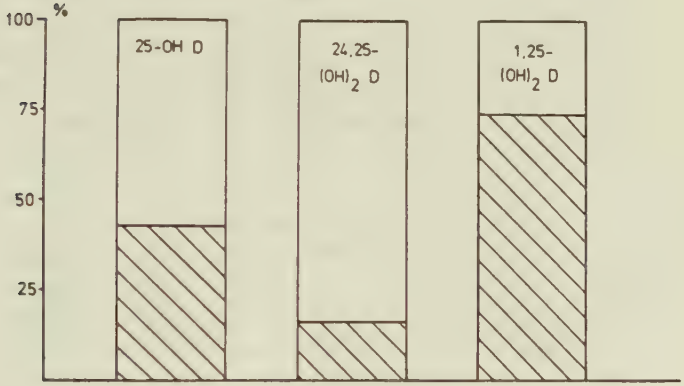
Insgesamt liegen bei den pankreatektomierten Patienten alle Serumkonzentrationen der Vitamin D-Metabolite unter den jeweiligen Vergleichswerten.Den deutlichsten Abfall gegenüber dem Vergleichswert kann das 24,25-Dihydroxy Vitamin D verzeichnen.Sein Wert beträgt nur 16 % der Bezugskonzentration,während die Konzentration an 25-OH D noch immerhin knapp die Hälfte,nämlich

Tabelle 3 : 25-OH D-, 24,25-$(OH)_2$ D- und 1,25-$(OH)_2$ D-Serumkonzentrationen bei Patienten mit Pankreatektomie

Patient	25-OH D 15 ± 5 ng/ml	24,25-$(OH)_2$ D 2,5 ± 1 ng/ml	1,25-$(OH)_2$ D 53 ± 11 pg/ml
12	1,4	0,30	20,5
3	1,7	0,28	85,5
13	2,6	0,27	-
14	2,9	0,23	27,7
1	3,3	0,28	27,1
15	3,3	0,25	47,2
6	3,6	0,43	72,2
5	4,0	0,30	27,1
2	7,1	0,17	53,1
9	7,9	0,50	-
7	9,1	0,77	18,2
10	9,2	0,53	17,8
4	11,6	0,28	46,9
11	18,8	1,00	30,8
8	22,1	0,53	10,3
$\bar{x} \pm s$	7,2 ± 6,2	0,41 ± 0,23	37,3 ± 22,5

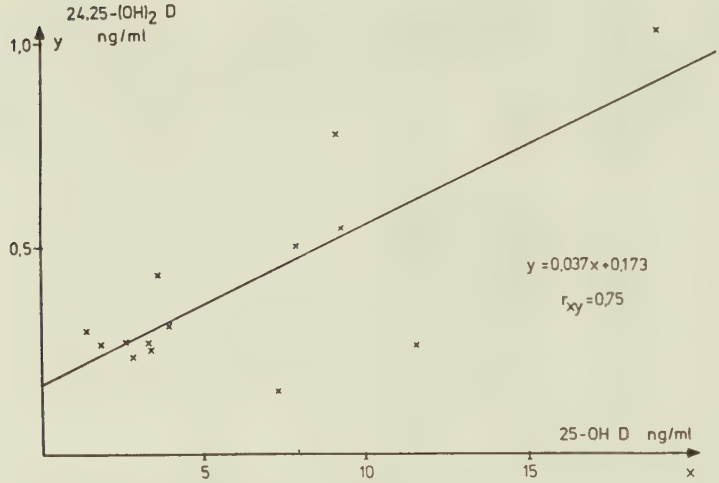
48 %, der Bezugskonzentration ausmacht. Der geringste Abfall gegenüber dem Vergleichswert ist bei dem 1,25-$(OH)_2$ D zu verzeichnen. Bei den untersuchten, pankreatektomierten Patienten sind dessen Serumspiegel nur auf 70 % gegenüber dem Vergleichswert abgesunken. Abbildung 4 zeigt das prozentuale Verhältnis der Serumkonzentrationen der Vitamin D-Metabolite bei Pankreatektomierten bezogen auf die Vergleichsgruppe.

Abbildung 4 : Prozentuales Verhältnis der Vitamin D-Metabolite bei Pankreatektomierten bezogen auf die Vergleichsgruppe



Zwischen den erniedrigten 25-OH D-Werten und den ebenso erniedrigten 24,25-$(OH)_2$ D-Werten besteht eine positive Korrelation,d.h. der Anstieg oder Abfall des einen Parameters bedingt die gleichläufige Änderung des anderen.Der Korrelationskoeffizient wurde mit r = 0,75 errechnet.Da der Metabolisierungsschritt vom 25-OH D zum 24,25-$(OH)_2$ D verläuft und nicht umkehrbar ist,kann eine lineare Abhängigkeit der beiden Metabolite voneinander nur in einer Richtung aufgestellt werden.Die Gleichung der Regressionsgeraden mit den 24,25-$(OH)_2$ D-Werten als abhängige Variable y und den 25-OH D-Werten als unabhängige Variable x lautet : $y = 0,037x + 0,17$.Diese Regressionsgerade ist in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5 : Abhängigkeit der 24,25-$(OH)_2$ D-Werte von den 25-OH D-Werten bei Patienten mit Pankreatektomie



Eine eindeutige Korrelation zwischen den 25-OH D-Werten und den 1,25-$(OH)_2$ D-Werten konnte wegen der großen Streubreite der letzteren nicht errechnet werden.

Bei 2 Patienten (Pat. 11 und 4) lag keine Erniedrigung des 25-OH D-Spiegels vor (18,8 und 11,6 ng/ml). Patient 4 erschien nach einem längeren Aufenthalt in südlichen Ländern stark sonnengebräunt zur Untersuchung,während bei Pat. 11 bereits 1 Monat nach erfolgter Pankreatektomie Blut zur Probe entnommen wurde.Patient 10,dem 3 Monate nach erfolgter Pankreatektomie Blut entnommen wurde,weist schon erniedrigte

Vitamin D-Metabolit-Konzentrationen auf.Bei dem Patienten 11 finden sich gleichzeitig das Serum-Kalzium,-magnesium und -phosphat an der unteren Normgrenze.Das erhöhte Parathormon erscheint als Zeichen eines sekundären,intestinalen Hyperparathyreoidismus bei herabgesetzter intestinaler Absorption.Trotz eines normalen 25-OH D-Spiegels liegt das 1,25-$(OH)_2$ D, also der aktive Metabolit,mit 30,8 pg/ml unterhalb des Bezugsbereiches und ist daher wahrscheinlich für den sekundären Hyperparathyreoidismus verantwortlich.

Patient 7 und 8 werden regelmäßig mit ADEK ^{R} substituiert (s.Tab. 1).Patient 7 erhielt die letzte ADEK-Ampulle 4 Wochen vor der Blutentnahme,Patient 8 3 Tage vorher.Dieser ist der einzige mit einem erhöhten 25-OH D-Wert (22,1 ng/ml) und einem an der oberen Normgrenze liegenden Serumkalzium von 2,6 mmol/l.Für die Auswirkung des Vitamin D-Stoßes auf die übrigen Metaboliten reichte die Zeit von 3 Tagen nicht aus. Ließe man aus diesem Grunde den 25-OH D-Wert des Patienten 8 in der statistischen Auswertung unberücksichtigt,so ergibt sich ein Mittelwert der 25-OH D-Serumkonzentrationen von 6,2 $\pm$ 4,8 ng/ml mit einem Variationskoeffizienten von 78,5 gegenüber 7,2 $\pm$ 6,2 ng/ml und einem Variationskoeffizienten von 85,6 %. Das prozentuale Verhältnis zu dem Vergleichswert würde von 48 % auf 41 % absinken.

Die Erhöhung der 1,25-$(OH)_2$ D-Werte bei den Patienten 3 und 6 auf 85,5 und 72,2 pg/ml bei niedrigen 25-OH D-Spiegeln von 1,7 und 3,6 ng/ml sowie die im Vergleichsbereich liegenden 1,25-$(OH)_2$ D-Werte der Patienten 2 und 15 mit 53,1 und 47,2 pg/ml bei 25-OH D-Spiegeln von 7,1 bzw. 3,3 ng/ml legen die Vermutung nahe,daß der Körper die niedrigen 25-OH D-Spiegel durch Stimulation der renalen 1α-Hydroxylase auszugleichen versucht.Bei den Patienten 2 und 15 liegen die Serum-

elektrolyte, alkalische Phosphatase und Parathormon im Normbereich, bei den Patienten 3 und 6 liegt nur der Phosphatspiegel unter der Norm bzw. grenzwertig.

6. DISKUSSION :

Von den verschiedenen Wegen, die zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von Vitamin D und seiner Metabolite führen können, sind die folgenden von besonderem klinischem Interesse : eine ungenügende Synthese in der Haut durch unzureichende UV-Bestrahlung, eine verminderte Aufnahme des in der Nahrung enthaltenen Vitamin D im Gefolge von Fettmalabsorption und der Verlust von endogenen, polaren Vitamin D-Metaboliten über eine Störung des enterohepatischen Kreislaufs. Nicht selten sind mehr als eine dieser Möglichkeiten Ursachen eines Vitamin D-Mangels.

Bei einer Reihe von Erkrankungen des Verdauungstraktes wie z.B. Leberzirrhose, chronische Cholestase, primär-biliäre Zirrhose, einheimische Sprue, exokrine Pankreas-insuffizienz, Zustand nach Gastrektomie oder Magenteil-resektion u.a.m. weisen klinisches Erscheinungsbild, verminderte 25-OH D-Werte oder pathologischer Ausfall von Absorptionsbestimmungen für Vitamin D auf einen Vitamin D-Mangelzustand hin (112,113,114,115,116, 117,118,119,120,121,122). Differenzierte Bestimmungen der Vitamin D-Metabolite liegen jedoch bislang nur für eine Patientengruppe mit einheimischer Sprue vor (123)

Thompson (31) fand bei 3 Patienten mit Pankreas-insuffizienz eine deutlich erniedrigte Absorptions-rate für Vitamin D_3 gegenüber gesunden Kontroll-personen. Trotz schwerer Steatorrhoe und Vitamin D_3-Aufnahmestörung waren Serumkalzium und -phosphat im Normbereich und nur bei einem Patienten, bei dem 11 Jahre zuvor eine Teilpankreatektomie erfolgt war, zeigte die Knochenbiopsie eine Osteomalazie. Möglicher-weise reichte bei den beiden anderen Patienten die

Zeit von 5 Monaten bzw. einem Jahr nicht zur Entwicklung des klinischen Bildes einer Osteomalazie aus.

Bei den von uns untersuchten Pankreatektomierten zeigten lediglich 2/15 (Pat.4 und 11) mit erniedrigten Kalzium-,Phosphat- und Magnesiumwerten sowie dem erhöhten Parathormon (s.Tab.2) die typische Befundkonstellation wie bei einem sekundären,intestinalen Hyperparathyreoidismus,während bei einem weiteren Patienten (Pat.6) lediglich eine Erhöhung des knochenspezifischen Isoenzyms der alkalischen Phosphatase und die geklagten Rückenschmerzen (s.Tab.1) sowie bei einem weiteren Patienten (Pat.15) nur die Schmerzsymptomatik Hinweis auf eine Knochenstoffwechselstörung gaben. 3 dieser Patienten (Pat.4,6,15) waren zum Untersuchungstermin länger als 2 Jahre operiert und hatten damit anscheinend genügend Zeit,eine Knochenstoffwechselstörung zu entwickeln.Der 4.Patient (Pat.11) war 3 Monate vor dem Untersuchungszeitpunkt wegen chronischer Pankreatitis operiert worden.Möglicherweise lag hier bereits längere Zeit vor der Operation eine ausgeprägte Verdauungsinsuffizienz vor.Die übrigen Frischoperierten (Pat. 10,13,14) wiesen weder klinisch noch anhand der Serumparameter eine Knochenstoffwechselstörung auf.
Während die Halbwertszeit des Vitamin D im Serum bei 22 Stunden liegt (34),scheint sie in den Depots Wochen bis Monate zu betragen.Diese lange Verweildauer wird mit dem langsamen turnover der Fettdepots erklärt, in denen Vitamin D den Befunden Rosenstreichs zufolge (124) hauptsächlich angereichert wird.Somit manifestiert sich ein Vitamin D-Mangel möglicherweise klinisch erst nach Erschöpfung der körpereigenen Vitamin D-Speicher.

Der Serum 25-OH D-Spiegel ist dazu geeignet,einen groben Überblick über den Vitamin D-Status abzugeben. Bei Ausschluß einer Störung des enterohepatischen Kreislaufs für Vitamin D und seine Metabolite sowie Hydroxylierungsstörungen z.B. bei chronischer Cholestase oder Leberzirrhose ist das Serum-25-OH D weitgehend von der Vitamin D-Zufuhr mit der Nahrung und der Synthese in der Haut abhängig.25-OH D ist der Vitamin D-Metabolit mit der höchsten Konzentration im Serum.Keck (125) maß im Oktober 1979 in Düsseldorf bei einer Vergleichsgruppe einen Mittelwert von 15,2 $\pm$ 5,0 ng/ml ($\bar{x} \pm s$).Demgegenüber liegt die Konzentration an zirkulierendem Vitamin D lediglich bei 1 ng/ml (126).

Verminderte 25-OH D-Werte bei Patienten mit Pankreasinsuffizienz wurden von Schoen (127) gemessen,der jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen erhöhter Fettausscheidung im Stuhl und vermindertem 25-OH D-Spiegel nachweisen konnte.Bei einem Vergleichswert von 29,5 $\pm$ 9,9 ng/ml 25-OH D lagen bei 20 von 31 Patienten mit Fettmalabsorption die Werte unter 12 ng/ml,bei weiteren 7 sogar unter 5 ng/ml.Ein weiterer Untersucher maß bei 10 von 15 Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz erniedrigte 25-OH D-Werte (128).

Diese Ergebnisse liegen in guter Übereinstimmung mit den von uns gefundenen Werten.Wir fanden in dem Kollektiv von 15 pankreatektomierten Patienten bei 12 eine Verminderung der 25-OH D-Werte,wobei das 25-OH D bei 8 Patienten auf weniger als ein Drittel des Vergleichswertes abgesunken war.Da die Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden waren,mußten jahreszeitliche Schwankungen - erhöhte Werte im Spätsommer gegenüber erniedrigten Werten im Frühjahr nach einem Winter mit geringer Sonnen-

einstrahlung (129,130) - unberücksichtigt gelassen werden.

Bei einer großen Streubreite,die sich in einem hohen Variationskoeffizienten von 85,6 % wiederspiegelt, fanden wir bei 15 Pankreatektomierten einen mittleren 25-OH D-Spiegel von 7,2 $\pm$ 6,2 ng/ml,der damit signifikant von dem zugrundegelegten Bezugswert (125) abweicht.Bei 3 Patienten konnte keine Veränderung der 25-OH D-Konzentration im Vergleich zu Gesunden festgestellt werden.Anamnestisch läßt sich hier eine außergewöhnliche Exposition gegenüber Sonnenlicht, erst kurz vor dem Untersuchungstermin erfolgte Pankreatektomie und Substitution mit 10 000 IE Vitamin D erheben,die diese Befunde möglicherweise erklären.

Bei einem Vitamin D-Mangelzustand,wie er bei den von uns untersuchten Patienten anhand der erheblich verminderten 25-OH D-Werte festgestellt wurde,ist möglicherweise mit Störungen im Kalzium- und Phosphathaushalt und mit den oben beschriebenen Kompensationsmechanismen inklusive deren Folgen für das Skelettsystem zu rechnen.
Obwohl bei den von uns untersuchten Patienten die Serumkonzentrationen bzw. -aktivitäten von Kalzium, Phosphat,Magnesium,alkalischer Phosphatase und Parathormon im statistischen Mittel nicht signifikant verändert waren,wiesen einzelne Befundkonstellationen eindeutig auf Störungen im Kalzium- und Phosphathaushalt und auf einen sekundären,intestinalen Hyperparathyreoidismus hin.Andererseits zeigen 3/15 Patienten keine,weitere 5 nur geringfügige Abweichungen in ihren Serumparametern trotz erniedrigter 25-OH D-Spiegel,sodaß dieser Metabolit alleine noch keine Aussage über die Auswirkung des Vitamin D-Mangels machen kann.

Von entscheidender Bedeutung ist das 1,25-$(OH)_2$ D, dessen Bezugswerte Keck (110) im Oktober 1979 für Düsseldorf mit 53 $\pm$ 11 pg/ml festlegte.

Zwar fand sich bei unseren Patienten auch hier ein signifikant erniedrigter Mittelwert von 37 $\pm$ 22,5 pg/ml,doch ist der Abfall gegenüber dem Vergleichswert wesentlich geringer als bei den 25-OH D-Spiegeln.Während im statistischen Mittel bezogen auf die Vergleichsgruppe das 25-OH D auf 48 % abgesunken war,betrug die Serumkonzentration des aktivsten Metaboliten 70 % des Bezugswertes.Neben 8 deutlich erniedrigten Serumkonzentrationen an 1,25-$(OH)_2$ D fanden sich jedoch auch 3 Werte innerhalb des Bezugsbereiches und 2 deutlich erhöht.Eine lineare Beziehung zu den jeweiligen 25-OH D-Werten ließ sich nicht feststellen.Dennoch läßt sich aus diesen Daten die Folgerung ziehen,daß in Anpassung an den Kalzium- und Phosphatbedarf des Körpers eine gesteigerte Synthese zu 1,25-$(OH)_2$ D vorliegt.

Versuche an Hühnern.zeigten,daß der Vitamin D-Gehalt der Nahrung sich weitaus stärker auf das zirkulierende 25-OH D als auf das 1,25-$(OH)_2$ D auswirkt.Hühner,die 3 Wochen lang Vitamin D-frei ernährt wurden,sanken mit ihren 25-OH D- und 1,25-$(OH)_2$ D-Spiegeln auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze,während exzessive Substitution mit Vitamin D nur zu einer Erhöhung der 25-OH D-Werte führte und die 1,25-$(OH)_2$ D-Werte im Normbereich blieben.Trotz geringer Abhängigkeit der 1,25-$(OH)_2$ D-Spiegel von der Vitamin D-Aufnahme ist ein Mindestangebot an Vitamin D zur Aufrechterhaltung physiologischer 1,25-$(OH)_2$ D-Spiegel notwendig (131). Die gleichen Untersucher bestätigten an Küken die Untersuchungen von Boyle (80),die an Ratten durchgeführt wurden,daß Hypokalzämie - bedingt durch vermin-

dertes Kalziumangebot mit der Nahrung - eine Erhöhung der 1,25-$(OH)_2$ D-Konzentration nach sich zieht.

Ebenso wie in diesen Tierversuchen keine lineare Beziehung zwischen 25-OH D-Werten und 1,25-$(OH)_2$ D-Werten hergestellt werden konnten, zeigen auch unsere Daten keine lineare Abhängigkeit. Bei 4/13 Patienten mit niedrigen 25-OH D-Werten läßt sich eine Gegenregulation durch die renale 1α-Hydroxylase vermuten, sodaß normale bzw. erhöhte 1,25-$(OH)_2$ D-Spiegel resultieren. Offen bleibt, ob bei den übrigen 6 Patienten mit niedrigen 25-OH D- und 1,25-$(OH)_2$ D-Werten eine nicht ausreichende Gegenregulation aufgetreten ist. Weiterhin läßt sich aus unseren Daten nicht ermitteln, warum im Einzelfall eine Gegenregulation stattgefunden oder nicht stattgefunden hat.

Eine Reihe von Untersuchungen aus jüngster Zeit weisen darauf hin, daß der menschliche Organismus bestrebt ist, die 1,25-$(OH)_2$ D-Konzentrationen in einem engen Rahmen konstant zu halten.

Jahreszeitliche Schwankungen der 25-OH D-Werte mit Höchstwerten im Spätsommer und Tiefstwerten nach dem Winter sind seit längerem bekannt (129,130) und wurden in einer neueren Untersuchung bestätigt, die überdies gleichläufige Schwankungen der 24,25-$(OH)_2$ D-konzentrationen und eine Konstanz in der Serumkonzentration des 1,25-$(OH)_2$ D ermittelte (132).

Chronische Vitamin D-Verluste mit dem Urin beim nephrotischen Syndrom führen zwar zu einer deutlichen Verminderung an zirkulierendem 25-OH D, die Auswirkungen auf das 1,25-$(OH)_2$ D und auf den Knochenstoffwechsel jedoch bleiben durch Gegenregulation aus (133).

Ähnliches gilt für Patienten unter antikonvulsiver

Langzeittherapie, die medikamentös induzierte Veränderungen im Vitamin D-Stoffwechsel aufweisen. Wie bei einem Teil unserer Patienten stehen hier deutlich erniedrigte 25-OH D- und 24,25-$(OH)_2$ D-Werte normalen 1,25-$(OH)_2$ D-Werten gegenüber (134). Hinweise für Auswirkungen auf das Skelettsystem fanden sich bei dieser Untersuchung nicht. Da bei unseren Patienten die 25-OH D-Werte prozentual zu den Vergleichsgruppen stärker abgefallen waren, reichte möglicherweise das Substratangebot nicht in jedem Falle für eine ausreichende Gegenregulation aus.

In einer kleinen Stichprobe an 3 Personen mit ernährungsbedingtem Vitamin D-Mangel demonstrierte Eastwood (135), daß bei extrem erniedrigten 25-OH D- und 24,25-$(OH)_2$ D-Werten noch normale 1,25-$(OH)_2$ D-Spiegel auftreten können, die allerdings nicht die Entwicklung einer Osteomalazie verhindern können.

Eine Untersuchung des Kalzium-, Phosphat- und Vitamin D-Stoffwechsels bei Patienten mit einheimischer Sprue (123) zeigte signifikante Erniedrigungen der Serumkonzentrationen der Vitamin D-Metabolite 25-OH D und 1,25-$(OH)_2$ D, die gut mit den veränderten Werten bei den Pankreatektomierten übereinstimmen (8,85 $\pm$ 4,2 ng/ml 25-OH D und 36,6 $\pm$ 14,0 pg/ml 1,25-$(OH)_2$ D bei der einheimischen Sprue versus 7,2 $\pm$ 6,2 ng/ml 25-OH D und 37,3 $\pm$ 22,5 pg/ml 1,25-$(OH)_2$ D bei den Pankreatektomierten). Die 24,25-$(OH)_2$ D-Serumkonzentration befand sich im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bei Pankreatektomierten im Normbereich. Da bei der einheimischen Sprue zusätzlich zur Vitamin D-Absorption wahrscheinlich der aktive und passive Transport von Kalzium und Phosphat über die geschädigte Darmmukosa gestört ist, resultieren weitaus gravierendere Störungen des Kalzium- und Phosphathaushaltes als bei Pankreatektomierten.

Die physiologische Bedeutung des letzten Metaboliten, des 24,25-$(OH)_2$ D, den wir in unserer Untersuchung bestimmten, ist in der Literatur umstritten. Bezogen auf die von Keck (110) festgelegten Vergleichswerte von 2,5 $\pm$ 1 ng/ml fanden wir bei diesem Metaboliten die stärkste Erniedrigung. Bei einer Durchschnittskonzentration von 0,41 $\pm$ 0,23 ng/ml fanden sich bei Pankreatektomierten nur 16 % der normalen Serumkonzentration gegenüber 48 % beim 25-OH D und 70 % beim 1,25-$(OH)_2$ D (s.Abb. 4).

Die Regulation der Synthese des 24,25-$(OH)_2$ D scheint weniger streng zu erfolgen als die Synthese des 1,25-$(OH)_2$ D. Im Gegensatz zu den 1,25-$(OH)_2$ D-Werten läßt sich eine lineare Abhängigkeit von den 25-OH D-Werten mit einem Korrelationskoeffizienten von + 0,75 ersehen und die Gleichung der Regressionsgeraden mit $y = 0{,}037x + 0{,}17$ aufstellen (s.Abb.5).

Aus in vitro Untersuchungen mit Zellkulturen aus Affennieren weiß man, daß 1,25-$(OH)_2$ D_3 und erhöhte Kalziumkonzentrationen die Syntheserate von 24,25-$(OH)_2$ D_3 zu stimulieren imstande sind, Parathormon dagegen eine hemmende Wirkung ausübt (89). Tanaka et al. (136, 137) stellten fest, daß Vitamin D-arm ernährte Hühner nach Gabe von radioaktiv markiertem 25-OH D_3 kein 24,25-$(OH)_2$ D_3 bilden, während dieser Metabolit bei normal ernährten Kontrolltieren schnell im Serum erscheint. Ferner konnten sie demonstrieren, daß 1,25-$(OH)_2$ D_3 die Bildung von 24,25-$(OH)_2$ D_3 induziert.

Soweit in vitro-Modelle und Tierversuche auf den Menschen übertragbar sind, ist es nicht verwunderlich, daß bei erniedrigten 1,25-$(OH)_2$ D-Spiegeln das zirkulierende 24,25-$(OH)_2$ D ebenfalls herabgesetzt ist. Die Tatsache, daß auch bei den Patienten mit normalen bzw. erhöhten 1,25-$(OH)_2$ D-Werten erniedrigte

$24,25\text{-}(OH)_2$ D-Konzentrationen vorlagen,macht deutlich, daß in die Regulation der $24,25\text{-}(OH)_2$ D-Synthese noch andere Faktoren eingehen müssen.Aus der positiv linearen Abhängigkeit der $24,25\text{-}(OH)_2$ D-Konzentrationen von den 25-OH D-Konzentrationen geht hervor,daß das Angebot an Substrat für die 24-Hydroxylase ebenfalls einen Einfluß auf das zirkulierende $24,25\text{-}(OH)_2$ D haben muß.

Die Befunde,daß die 24-Hydroxylase durch den aktivsten Metaboliten induziert wird und daß die 24-Hydroxylierung des 25-OH D_3 dessen biologische Wirkung nicht steigert,legt die Vermutung nahe,daß es sich hierbei um einen ersten Schritt zum Abbau und Inaktivierung von Vitamin D handelt.Daß bei Vitamin D-Mangelzuständen und erhöhtem Bedarf an aktivem Metabolit,wie es bei unserem Patientengut der Fall ist, das zirkulierende $24,25\text{-}(OH)_2$ D den stärksten Abfall zu verzeichnen hat,unterstützt diese Hypothese. Versuche an Ratten und Küken mit 24,24-Difluoro-25-hydroxy-vitamin D_3,einem synthetischen Derivat des 25-OH D_3 ,das nicht in Position 24 hydroxyliert werden kann,aber die biologische Aktivität des 25-OH D_3 besitzt,führten zu keinen Störungen im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel und zu keinem Skelettanomalien (138).Garabedian (139) konnte nachweisen,daß $24,25\text{-}(OH)_2$ D_3 imstande ist,die Knochenresorption, die durch Parathormon vermittelt wird,zu blockieren und die Kalziumaufnahme durch Knochenzellen zu fördern. Während sich in den Untersuchungen von Tanaka und DeLuca (140) das $1,25\text{-}(OH)_2$ D_3 alleine verabreicht als ein ausgezeichnetes Therapeutikum für rachitische Ratten herausstellte,belegte Bordier (141) anhand histologischer Auswertungen von menschlichen Knochenbiopsien,daß für optimales Wachstum und Mineralisation

des Knochens zusätzlich zum 1,25-$(OH)_2$ D_3 ein weiterer Vitamin D-Metabolit vorhanden sein muß.Ob diese zusätzliche Wirkung dem 25-OH D_3 oder dem 24,25-$(OH)_2$ D_3 zukommt,konnte in dieser Untersuchung nicht exakt geklärt werden.
Malluche (142) führte an rachitischen Hühnern Versuche durch,die belegen,daß für die Erhaltung der Knochenmasse,die Kontrolle des Längenwachstums und die Mineralisierung der Knochengrundsubstanz in erster Linie das 1,25-$(OH)_2$ D_3 verantwortlich ist.Niedrige Konzentrationen des 24,25-$(OH)_2$ D_3 unterstützen den Effekt des 1,25-$(OH)_2$ D_3,sodaß man schließen muß,daß für die Aufrechterhaltung eines normalen Knochenstoffwechsels beide Metabolite in einem ausgewogenen Verhältnis vorhanden sein müssen.Diese Hypothese findet Unterstützung in den Befunden,daß menschliche Spongiosa bzw. Knochenzellen aus 25-OH D_3 neben 1,25-$(OH)_2D_3$ auch 24,25-$(OH)_2$ D_3 produzieren (71,72,73).
Solange jedoch die Rolle des 24,25-$(OH)_2$ D für den Knochenstoffwechsel des Menschen nicht eindeutig geklärt ist,muß die Frage offen bleiben,ob der - wenn auch stark herabgesetzten - Produktion von 24,25-$(OH)_2$ D bei einem Vitamin D-Mangel eine physiologische Bedeutung zukommt.

7. SCHLUSSBEMERKUNGEN :

Unabhängig von theoretischen Erörterungen,die noch ergänzender Untersuchungen bedürfen,stellt sich die Frage nach den therapeutischen Konsequenzen unserer Ergebnisse.

Unsere Ergebnisse belegen eindeutig,daß bei Pankreatektomierten trotz Ersatz der fehlenden Pankreasenzyme eine Fettverdauungsstörung vorliegt,die im

weiteren Verlauf zu einem Vitamin D-Mangel führen kann. Diesem Mangelzustand kann möglicherweise durch den endokrinen Regelkreis des Vitamin D entgegengewirkt werden, er muß jedoch im Einzelfall nicht zwangsläufig komplett ausgeglichen werden, sodaß Störungen des Knochenstoffwechsels resultieren. Eine prophylaktische Substitutionstherapie ist somit angezeigt.

Da wie oben ausgeführt möglicherweise der aktivste Metabolit, das 1,25-$(OH)_2$ D_3, nicht alleine für einen normalen Knochenstoffwechsel verantwortlich ist, sondern möglicherweise auch eine gewisse Menge an 24,25-$(OH)_2$ D_3 und 25-OH D_3 vorhanden sein muß, erscheint eine Substitution mit Vitamin D_3 oder mit 25-OH D_3 am sinnvollsten.

Ausgehend von einem mittleren Tagesbedarf eines Erwachsenen von ca. 600 IE Vitamin D, von denen in der Regel 50 % in der Haut gebildet werden, ergibt sich ein zusätzlicher monatlicher Bedarf von 9000 IE Vitamin D. Dieser Bedarf läßt sich, abgesehen von der Vitamin D-Aufnahme mit der Nahrung, gut mit handelsüblichen Präparaten abdecken.
Seit kurzem steht auch 25-OH D_3 für die Therapie auf dem Arzneimittelmarkt zur Verfügung. Im Gegensatz zu Vitamin D, das parenteral verabreicht werden muß, kann 25-OH D_3 oral gegeben werden, da seine Absorption durch die polare Hydroxylgruppre weniger von der Absorption der Nahrungsfette abhängig ist. Jedoch liegen zur Zeit keine klinischen Erfahrungen bezüglich der Dosierung bei exokriner Pankreasinsuffizienz vor.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Patienten mit Pankreatektomie können infolge der gestörten Fettabsorption Vitamin D-Mangelzustände entwickeln,die sich in niedrigen 25-OH D-Werten,Ausbildung einer Osteomalazie und eines sekundären,intestinalen Hyperparathyreoidismus ausdrücken.

Wir untersuchten 13 Patienten mit totaler Pankreatektomie und 2 Patienten mit Pankreasteilresektion im Alter zwischen 34 und 66 Jahren ($\bar{x}$ = 47,1 J.),die sämtlich mit Pankreasenzymen substituiert wurden.

Im statistischen Mittel waren die Serumkonzentrationen von Kalzium,Magnesium,Phosphat und Parathormon nicht signifikant verändert,jedoch zeigen 2 Patienten mit niedrigen Kalzium-,Phosphat- und Magnesiumspiegeln sowie erhöhtem Parathormon im Serum die typische Befundkonstellation wie bei einem sekundären,intestinalen Hyperparathyreoidismus.Bei 2 Patienten mit dem klinischen Beschwerdebild einer Osteomalazie fand sich bei der Auftrennung der alkalischen Phosphatase im Serum eine Erhöhung des knochenspezifischen Isoenzyms.

Die Serumkonzentration des 25-OH D lag mit 7,2 $\pm$ 6,2 ng/ml (Vergleichswert: 15 $\pm$ 5 ng/ml) signifikant ($p<0,01$) zu niedrig,wobei sie bei 8 Patienten auf weniger als ein Drittel des Vergleichswertes abgesunken war.Mit 37 $\pm$ 22,5 pg/ml (Vergleichswert: 53 $\pm$ 11 pg/ml) lagen die 1,25-$(OH)_2$ D-Werte sowie mit 0,41 $\pm$ 0,23 ng/ml (Vergleichsgruppe: 2,5 $\pm$ 1 ng/ml) die 24,25-$(OH)_2$ D-Werte signifikant ($p<0,01$) zu niedrig.Während im statistischen Mittel bezogen auf die Vergleichsgruppe das 25-OH D auf 48 % und das 24,25-$(OH)_2$ D auf 16 % abgesunken war,betrug die Serumkonzentration des aktivsten Metaboliten 70 % des Bezugswertes.4 Patienten mit erniedrigten 25-OH D-Werten wiesen normale bis erhöhte 1,25-$(OH)_2$ D-Werte auf.

Eine positive lineare Abhängigkeit der 24,25-$(OH)_2$ D-Konzentration von der 25-OH D-Konzentration mit einem Korrelationskoeffizienten von r = + 0,75 ließ sich ermitteln.

Diese Daten lassen den Schluß zu, daß bei Pankreatektomierten aufgrund der Fettmalabsorption ein Vitamin D-Mangel entsteht, der sich in erniedrigten 25-OH D-Spiegeln nachweisen läßt. In Anpassung an seinen Kalzium- und Phosphatbedarf versucht der Organismus durch Steigerung der Synthese des 1,25-$(OH)_2$ D und Hemmung der Bildung des 24,25-$(OH)_2$ D diesen Mangel auszugleichen. Für die Regulation der 24,25-$(OH)_2$ D-Synthese scheint ferner das Angebot an Substrat Bedeutung zu haben.

Da bei Pankreatektomierten trotz Ersatz der fehlenden Pankreasenzyme Vitamin D-Mangelzustände mit ihren Folgen für das Skelettsystem auftreten können, die nicht in jedem Fall durch den endokrinen Regelkreis des Vitamin D mit seiner Möglichkeit der Bedarfsregulierung ausgeglichen werden können, ist eine prophylaktische Substitutionstherapie mit mindestens 10 000 IE Vitamin D monatlich intramuskulär verabreicht angezeigt.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. H.L. Krüskemper danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. E. Keck für die Überlassung des Themas,die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und die Ratschläge bei der Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.

Frau C.Noelle und Frau M.Pier danke ich für die ausgezeichnete technische Anleitung.

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

		Seite
Tab. 1	Allgemeine Daten der Patienten mit Pankreatektomie.....	17
Abb. 1.1.	Elutionsprofil markierter Vitamin D_3-Metabolite auf der 1. LH 20-Säule.....	22
Abb. 1.2.	Elutionsprofil markierter Vitamin D_3-Metabolite auf der 2. LH 20-Säule.....	22
Abb. 1.3.	Elutionsprofil markierter Vitamin D_3-Metabolite auf der HPLC.....	23
Abb. 2.1.	Standardkurve zur Bestimmung des 25-OH D.....	25
Abb. 2.2.	Standardkurve zur Bestimmung des 24,25-$(OH)_2$ D.....	26
Abb. 2.3.	Standardkurve zur Bestimmung des 1,25-$(OH)_2$ D.....	28
Tab. 2	Serumparameter der pankreatektomierten Patienten.....	33

Seite

Abb. 3 Verteilung der Isoenzyme der alkalischen Serumphosphatase bei Patient 7 mit Cholestase und bei Patient 4 mit Osteomalazie..... 35

Tab. 3 25-OH D-, 24,25-$(OH)_2$ D- und 1,25-$(OH)_2$ D- Serumkonzentrationen bei Patienten mit Pankreatektomie..... 38

Abb. 4 Prozentuales Verhätnis der Vitamin D-Metabolite bei Pankreatektomierten bezogen auf die Vergleichsgruppe..... 39

Abb. 5 Abhängigkeit der 24,25-$(OH)_2$ D - Werte von den 25-OH D - Werten bei Patienten mit Pankreatektomie..... 40

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 Priestley, J.T., M.W. Comfort, J. Radcliffe :
Total pancreatectomy for hyperinsulinism due to an isletcell adenoma: Survival and cure at sixteen months after operation; presentation of metabolic studies.
Ann Surg 119: 211 (1944)

2 Pliam, M.B., W.H. Remine :
Further evaluation of total pancreatectomy.
Arch Surg 110: 506 (1975)

3 Trede, M. :
Die totale Pankreatektomie.
Langenbecks Arch Chir 340: 227 (1976)

4 Greenberger, N.J., P.P. Toskes, K.J. Isselbacher :
Diseases of the pancreas.
In : Harrison's Principles of internal medicine.
Isselbacher, K.J., R.D. Adams, E. Braunwald, R.G. Petersdorf, J.D. Wilson (eds.)
International Student Edition
Ninth Edition: 1523 (1980)

5 Kümmerle, F., K. Beck, T. Tenner :
Leben ohne Pankreas.
Dtsch med Wschr 94: 691 (1969)

6 Koch, E., F.X. Sailer :
Mehrjährige Beobachtungen an zwei Totalpankreatektomierten.
Dtsch med Wschr 52: 2499 (1963)

7 Schultis, K., E. Wagner :
Zur Enzymsubstitution nach Pankreatektomie und bei Insuffizienz des exokrinen Pankreas.
Dtsch med Wschr 36: 1685 (1968)

8 Schultis, K., I.E. Wildberger, E. Wagner :
Beobachtungen zur Substitution mit Depot-Glukagon nach totaler Pankreatektomie.
Klin Wschr 45: 956 (1967)

9 Cremer, B., K. Beck :
Pankreasoperationen.
In : Handbuch der Inneren Medizin, Verdauungsorgane Teil 6 " Pankreas " .5.Auflage
M.M. Forell (Hrsg.), Berlin-Heidelberg-New York, Springer. 1107 (1976)

10 Kulla, A. :
Die Situation des pankreatektomierten Menschen.
Z Allg Med 55: 1478 (1979)

11 Urban, V., M. Poll, F. Willig, F.H. Schmidt, M. Trede :
Stoffwechseleinstellung nach totaler Pankreatektomie.Erfahrungsbericht anhand von 21 Fällen mit vollständiger Entfernung der Bauchspeicheldrüse.
Verh Dtsch Ges Inn Med, 84. Kongreß: 1053 (1978)

12 Creutzfeldt, W.:
Der Diabetes des pankreaslosen Menschen.
In : Pfeiffer, E.F. (Hersg.) : Handbuch des Diabetes mellitus. München, J.F. Lehmanns, Band II, 239 (1971)

13 Schultis, K., E. Wagner : Zur Enzymsubstitution nach Pankreatektomie und bei Insuffizienz des exokrinen Pankreas.
Dtsch med Wschr 36: 1685 (1968)

14 Wanitschke, R., K. Ewe, J.P. Oyelowo : Maldigestion nach Pankreasresektionen und ihre therapeutische Beeinflußbarkeit.
Dtsch med Wschr 98: 1212 (1973)

15 Beck, K., M. Helms, R. Augustin : Die Behandlung von Nahrungsausnutzungsstörungen unter Verwendung von Fetten mit mittelkettigen Fettsäuren.
Medizin und Ernährung 9: 201 (1968)

16 Hashim, S.A., H.B. Roholt, T.B. Itallie : Pancreatogenous steatorrhea treated with medium-chain triglyceride.
Clin Res 10: 396 (1962)

17 Idler, D.R., C.A. Baumann : Skin sterols. II. Isolation of Δ^7-cholesterol.
J Biol Chem 195: 623 (1952)

18 Hollick, M.F., J.E. Frommer, S.C. McNeill, N.M. Richtand, J.W. Henley, J.T. Potts jr. : Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D_3 in skin.
Biophys Res Commun 76: 107 (1977)

19 Hollick, M.F., M.B. Clark : The photobiogenesis and metabolism of vitamin D.
Fed Proc 37: 2567 (1978)

20 Hollick, M.F., S.A. Hollick, S.M. McNeill, N.M. Richtand, M.B. Clark, J.T. Potts jr. : The photo-biochemistry of vitamin D_3 in vivo in the skin.
In : Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F.DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds), Berlin, de Gruyter S. 173 (1979)

21 Stamp,T.C.B., J.G. Haddad, C.A. Twigg : Comparison of oral 25-hydroxy cholecalciferol, vitamin D and UV light as determinants of circulating 25-hydroxy vitamin D.
Lancet 1: 1341 (1977)

22 Jones, G., B. Byrnes, D. Duthie, K.N. Jeejeeboy : Contribution of skin vitamin D_3 synthesis in patients receiving total parenteral nutrition.
In : Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds). Berlin, de Gruyter S. 169 (1979)

23 Norman, A.W., H.F. DeLuca : The preparation of ^{3}H-vitamin D_2 and D_3 and their localisation in the rat.
Biochemistry 2: 1160 (1963)

24 Callow, R.F., E. Kodicek, G.A. Thompson : Metabolism of tritriated vitamin D.
Proc Roy Soc London, Ser. B 164: 1 (1966)

25 Schachter, D., J.D. Finkelstein, S. Kowarsky :
Metabolism of vitamin D. I. Preparation of radioactive vitamin D and its intestinal absorption in the rat.
J Clin Invest 43: 787 (1964)

26 Avioli, L.V. :
Absorption and metabolism of vitamin D_3 in man.
Amer J Clin Nutr 22: 437 (1969)

27 Thompson, W.G., G.R. Thompson :
Effect of cholestyramin on the absorption of vitamin D_3 and calcium.
Gut 10: 717 (1969)

28 Heaton, K.W., J.V. Lever, D. Barnard :
Osteomalacia associated with cholestyramine therapy for postileectomy diarrhea.
Gastroenterology 62: 642 (1972)

29 Thompson, G.R., R.K. Ockner, K.J. Isselbacher :
Effect of mixed micellar lipid on the absorption of cholesterol and vitamin D into lymph.
J Clin Invest 48: 87 (1969)

30 Dueland, S., J.I. Pedersen, P. Helgerud, C.A. Drevon :
Transport of vitamin D_3 from rat intestine: evidence for transfer of vitamin D_3 from chylomicrons to α-globulins.
In : Vitamin D, chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit (eds)
Berlin, de Gruyter (1982)

31 Thompson, G.R., B. Lewis, C.C. Born :
Absorption of vitamin D_3-^3H in control subjects and patients with intestinal malabsorption.
J Clin Invest 45: 94 (1966)

32 Blomstrand, R., L. Forsgren :
Intestinal absorption and esterification of vitamin D_3-1,2-^3H in man.
Acta Chem Scand 21: 1662 (1967)

33 Avioli, L.V., W. Lee :
Intestinal absorption and metabolism of vitamin D_3 in man.
Abstr. 3rd Intern. Congr. Endocrin., Mexico City, S. 101 (1968)

34 Avioli, L.V., S.W. Lee, J.E. McDonald, J. Lund, H.F. DeLuca :
Metabolism of vitamin D_3-^3H in human subjects: Distribution in blood, bile, feces and urine.
J Clin Invest 46: 983 (1967)

35 Arnaud, S.B., R.S. Goldsmith, P.W. Lambert et al :
25-hydroxy vitamin D_3: Evidence of an enterohepatic circulation in man.
Proc Soc Exp Biol Med 149: 570 (1975)

36 Kumar, R., S. Nagubandi, V.R. Mattox, J.M. Londowsky :
Enterohepatic physiology of 1,25-dihydroxy vitamin D.
B J Clin Invest 65: 277 (1980)

37 Kumar, R. :
Enterohepatic physiology of dihydroxylated vitamin D_3 metabolites.
In : Vitamin D, chemical,biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit.Berlin de Gruyter 635 (1982)

38 Nagubandi, S., R. Kumar, J.M. Londowsky, R.A. Conradino, P.S. Tietz :
Role of vitamin D glucosiduronate in calcium homeostasis.
J Clin Invest 66: 1274 (1980)

39 Ponchon, G., H.F. DeLuca :
The role of the liver in the metabolism of vitamin D.
J Clin Invest 48: 1273 (1969)

40 Ponchon, G., A.L. Kennan, H.F. DeLuca :
"Activation" of vitamin D by the liver.
J Clin Invest 48: 2032 (1969)

41 Blunt, J.W., H.F. DeLuca, H.K. Schnoes :
25-hydroxycholecalciferol.A biologically active metabolite of vitamin D_3.
Biochem 7: 3317 (1968)

42 Bhattacharryya, M.H., H.F. DeLuca :
Subcellular location of rat liver calciferol-25-hydroxylase.
Arch Biochem Biophys 160: 58 (1974)

43 Horsting, M., H.F. DeLuca :
In vitro production of 25-hydroxycholecalciferol.
Biochem Biophys Res Commun 36: 251 (1969)

44 Madhok, T.C., H.K. Schnoes, H.F. DeLuca :
Mechanism of 25-hydroxy vitamin D_3-24-hydroxylation: incorporation of oxygen-18 into the 24-position of 25-hydroxy vitamin D_3.
Biochem 16: 2142 (1977)

45 Cinti, D.L., E.E. Golub, F. Bronner :
25-Hydroxycholecalciferol: high affinity substrate for hepatic cytochrome P-450.
Biochem Biophys Res Commun 72: 546 (1976)

46 Yoon, D.S., H.F. DeLuca :
Resolution and reconstitution of soluble components of rat liver microsomal vitamin D_3-hydroxylase.
Arch Biochem Biophys 203: 529 (1980)

47 Björkhem, I., I. Holmberg :
Assay and properties of a mitochondrial 25-hydroxylase active on vitamin D_3.
J Biol Chem 253: 842 (1978)

48 Tucker,G., R.E. Gagnon, M.R. Haussler :
Vitamin D_3-25-hydroxylase: tissue occurence and apparent lack of regulation.
Arch Biochem Biophys 155: 47 (1973)

49 Bhattacharryya, M.H., H.F. DeLuca :
The regulation of rat liver calciferol-25-hydroxylase.
J Biol Chem 248: 2969 (1973)

50 Haddad, J.G., T.C.B. Stamp :
Circulating 25-hydroxyvitamin D in man.
Amer J Med 57: 57 (1974)

51 Stanbury, S.W., E.B. Mawer, C.M. Taylor et al :
The skin, vitamin D and the control of its hydroxylation.
Min Elect Metab 3: 51 (1980)

52 Davies, M., E.B. Mawer :
Control of the hepatic 25-hydroxylation of vitamin D in man.
In: Vitamin D, chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit (eds). Berlin, de Gruyter, 523 (1982)

53 Boyle, I.T., L. Miravet, R.W. Gray, M.F. Hollick, H.F. DeLuca :
The response of intestinal calcium transport to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in nephrectomized rats.
Endocrinology 90: 605 (1972)

54 Haddad, J.G., J. Walgate :
25-Hydroxyvitamin D transport in human plasma. Isolation and partial characterization of calciferol-binding protein.
J Biol Chem 251: 4803 (1976)

55 Imawari, M., K. Kida, D.S. Goodman :
The transport of vitamin D and its 25-hydroxy metabolite in human plasma.
J Clin Invest 58: 514 (1976)

56 Bouillon, R., H. van Baelen :
The transport of vitamin D : significance of free and total concentrations of vitamin D metabolites.
In: Vitamin D, chemical,biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit (eds) Berlin, de Gruyter: 1183 (1982)

57 Gray, R.W., J.L. Ohmdahl, J.G. Ghazarian, H.F. DeLuca :
25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase: subcellular location and properties.
J Biol Chem 247: 7528 (1972)

58 Brunette, M.G., M. Chan, C. Ferriere, K.D. Roberts:
The site of synthesis of 1,25-$(OH)_2$ vitamin D_3 in the kidney. A microenzymatic assay on isolated tubules.
In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds) Berlin,de Gruyter: 463 (1979)

59 Ghazarian, J.G., H.F. DeLuca :
25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase: a specific requirement for NADPH and a hemo-protein component of chick kidney mitochondria.
Arch Biochem Biophys 160: 63 (1974)

60 Ghazarian, J.G., C.R. Jefcoate, J.C. Knutson, W.H. Orme-Johnson, H.F. DeLuca :
Mitochondrial cytochrome P 450: a component of

chick kidney 25-hydroxycholecalciferol-1α-hydroxylase.
J Biol Biochem 249: 3026 (1974)

61 Hollick, M.F., H.K. Schnoes, H.F. DeLuca : Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D_3 metabolically active in the intestine.
Proc Nat Acad Sci USA 68: 803 (1971)

62 Lawson, D.M., D.R. Fraser, E. Kodicek et al : Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a kidney hormone controlling calcium metabolism.
Nature 230: 228 (1971)

63 Boyle, I.T., L. Miravet, R.V. Gray et al : The response of intestinal calcium transport to 25-hydroxy and 1,25-dihydroxy vitamin D in nephrectomized rats.
Endocrinology 90: 605 (1972)

64 Wong, R.G., A.W. Norman, C.R. Reddy, J.W. Coburn :
Biologic effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol (a highly active vitamin D metabolite) in acutely uremic rats.
J Clin Invest 51: 1287 (1972)

65 Holick, M.F., M. Garabedian, H.F. DeLuca : 1,25-Dihydroxycholecalciferol: metabolite of vitamin D_3 active on bone in anephric rats.
Science 176: 1146 (1972)

66 Frolick, C.A., H.F. DeLuca :
Metabolism of 1,25-dihydroxycholecalciferol

in the rat.
J Clin Invest 51: 2900 (1972)

67 Fraser, D.R., E. Kodicek :
Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite.
Nature 228: 764 (1970)

68 Ross, R., A.D. Care :
Persistance of 1,25-$(OH)_2$ D in nephrectomized sheep.
In: Vitamin D, chemical,biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit (eds)
Berlin,de Gruyter: 47 (1982)

69 Gray, T.K., G.E. Lester, K.V. Spey jr, D. Rabin :
Synthesis of 1,25-dihydroxy vitamin D_3 by human placental cells in culture.
Clin Res 28,2: 393 A (1980)

70 Weisman, Y., A. Vargas, G. Duchett, E. Reiter, A.W. Root :
Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in the nephrectomized pregnant rat.
Endocrinology 103,6: 1992 (1978)

71 Keck, E., R. Durdel, H.U. Schweikert, W. Meier, U. Hennes, F. Krück, H.L. Krüskemper :
Metabolism of 25-hydroxycholecalciferol in human spongiosa.
Sixth International Congress of Endocrinology, Melbourne, Program and abstracts: 254 (1980)

72 Howard, G.A., R.T. Turner, J.E. Puzas, D.R. Knapp, D.J. Baylink, F. Nichols :
Bone cells in culture synthesize 1α,25-$(OH)_2$ D_3 and 24,25-$(OH)_2$ D_3 as determined by mass spectrometry.
In: Vitamin D, chemical,biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit (eds) Berlin, de Gruyter: 3 (1982)

73 Turner, R.T., J.E. Puzas, M. Forte et al :
Calvaria cells synthesize dihydroxy metabolites of vitamin D.
Presented at the 2nd Annual Meeting of The American Society for Bone and Mineral Research (1980)

74 Knutson, J.C., H.F. DeLuca :
25-Hydroxyvitamin D_3-24-hydroxylase: subcellular location and properties.
Biochemistry 13: 1543 (1974)

75 Holick, M.F., H.K. Schnoes, H.F. DeLuca, R.W. Gray, I.T. Boyle, T. Suda :
Isolation and identification of 24,25-dihydroxy-cholecalciferol: a metabolite of vitamin D_3 made in the kidney.
Biochemistry 11: 4251 (1972)

76 Boyle, I.T., J.L Ohmdal, R.W. Gray, H.F. DeLuca :
The biological activity and metabolism of 24,25-dihydroxyvitamin D_3.
J Biol Chem 248: 4174 (1972)

77 Haddad, J.G., C.Min, M. Mendelsohn, E. Slatopolsky,

T.J. Hahn :
Competetive protein-binding radioassay for 24,25-dihydroxyvitamin D in sera from normal and anephric subjects.
Arch Biochem Biophys 182: 390 (1977)

78 Kumar, R., H.K. Schnoes, H.F. DeLuca :
Rat intestinal 25-hydroxyvitamin D_3- and 1∝,25-dihydroxyvitamin D_3-24-hydroxylase.
J Biol Chem 253: 3804 (1978)

79 Garabedian, M., T. Corvol, M. Bailly du Bois, M. Lieberherr, S. Balsan :
The biological activity of 24,25-dihydroxycholecalciferol on cultured chondrocytes and its in vitro production in cartilage and calvarium.
In: Proceedings of the sixth parathyroid conference, University of Columbia, Vancouver, Abstracts: 160 (1977)

80 Boyle, I.T., R.W. Gray, J.W. Omdahl, H.F. DeLuca :
Calcium control of the in vivo biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D_3: Nicolaysen's endogenous factor.
In: Endocrinology. Proceedings of the third international symposium. S. Taylor (ed), London, Heinemann Medical: 78 (1971)

81 Garabedian, M., M.F. Hollick, H.F. DeLuca, I.T. Boyle :
Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands.
Proc Nat Acad Sci USA 69: 1673 (1972)

82 Baxter, L.A., H.F. DeLuca :

Stimulation of 25-hydroxyvitamin D_3-1α-hydroxylase by phosphate depletion.
J Biol Chem 251: 3158 (1976)

83 Tanaka,Y., H.F. DeLuca :
The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus.
Arch Biochem Biophys 154: 566 (1973)

84 Spencer, E.M., O. Tobiassen, P. Ling, E. Braunstein :
Growth hormone and prolactin action on vitamin D metabolism in the rat.
In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds). Berlin, de Gruyter: 475 (1979)

85 MacIntyre, I..:
Comparative aspects of the biochemistry of the regulation of vitamin D metabolism.
In: Vitamin D, biochemical,chemical and clinical aspects related to calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, D. Fraser, H.G. Grigoleit, D.v. Herrath (eds). Berlin, de Gruyter: 155 (1977)

86 Larkins, R.G., S.J. MacAuley, A. Rapoport, T.J. Martin, B.R. Tulloch, P.G. Byfield, E.W. Matthews, I. MacIntyre :
Effects of nucleotids,hormones,ions, and 1,25-dihydroxycholecalciferol on 1,25-dihydroxycholecalciferol production in isolated chick renal tubules.

Clin Sci Molec Med 46: 569 (1974)

87 Bikle, D.D., E.M. Spencer, W.H. Burke et al :
Prolactin but not growth hormone stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D_3 production by chick renal preparations in vitro.
Endocrinology 107: 82 (1980)

88 Wark, J.D., R.G. Larkins, J.A. Eisman, T.J. Martin:
Prostaglandins and 25-hydroxyvitamin D-1α-hydroxylase.
In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds). Berlin, de Gruyter: 563 (1979)

89 Juan, D., H.F. DeLuca :
The regulation of 24,25-dihydroxyvitamin D_3 production in cultures of monkey kidney cells.
Endocrinology 101: 1184 (1977)

90 Henry, H.L. :
Response of chick kidney cell cultures to 1,25-dihydroxyvitamin D_3.
In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K.Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds.). Berlin, de Gruyter: 467 (1979)

91 Potts jr, J.T. :
Introductory remarks.
In: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin. R.V. Talmage, L.F. Belanger (eds). Amsterdam,

Excerpta medica: 403 (1968)

92 Kleemann, C.R., D. Bernstein, R. Rockney et al :
Studies on the renal clearance of diffusible calcium and the role of the parathyroid glands in its regulation.
In: The parathyroids. R.O. Greep, R.V. Talmage (eds). Springfield, Charles C Thomas Publisher: 353 (1961)

93 Fraser, D.R., E. Kodicek :
Regulation of 25-hydroxycholecalciferol-1α-hydroxylase in kidney by parathyroid hormone.
Nature New Biol 241: 163 (1973)

94 Wassermann, R.H., A.N. Taylor :
Vitamin D-dependent calcium-binding protein in chick intestinal mucosa.
Science 152: 791 (1966)

95 Garabedian, M., Y. Tanaka, M.F. Holick, H.F. DeLuca :
Response of intestinal calcium transport and bone calcium mobilization to 1,25-dihydroxy-vitamin D_3 in thyroparathyroidectomized rats.
Endocrinology 94: 1022 (1974)

96 Sutton, R.A.L., C.A. Harris, N.M.L. :
Effects of vitamin D on renal tubular calcium transport.
In: Vitamin D, biochemical,chemical and clinical aspects related to calcium metabolism. A.W. Norman, K.Schaefer, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, D. Fraser, H.G. Grigoleit, D.v. Herrath (eds). Berlin, de Gruyter: 451 (1977)

97 Raisz, L.G., C.L. Trummel, M.F. Hollick, H.F. DeLuca :
1,25-Dihydroxycholecalciferol: a potent stimulator of bone resorption in tissue culture.
Science 175: 768 (1972)

98 Wong, G.L., R.A. Luben, D.V. Cohn :
1,25-Dihydroxycholecalciferol and parathormone: effects on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells.
Science 197: 663 (1977)

99 Cohn, D.V., G.L. Wong :
The actions of parathormone, calcitonin and 1,25-dihydroxycholecalciferol on isolated osteoclast- and osteoblast-like cells in culture.
In: Endocrinology of calcium metabolism.
D.H. Copp, R.V. Talmage (eds). Amsterdam, Excerpta Medica: 241 (1978)

100 Keck, E. :
Unveröffentlichte Ergebnisse.
Prof. Dr. Dr. Elmar Keck, Medizinische Klinik und Poliklinik C der Universität Düsseldorf, Moorenstr. 5 , 4000 Düsseldorf

101 Morgan, D.B., C.R. Paterson, C.G. Woods, C.N. Pulvertaft, P. Fourman :
Osteomalacia after gastrectomy.
Lancet 27: 1089 (1965)

102 Thompson, G.R., B. Lewis, C.C. Booth :
Vitamin D absorption after partial gastrectomy.
Lancet 26: 457 (1966)

103 Gertner, J.M., M. Lilburn, M. Domenech :

25-Hydroxycholecalciferol absorption in steatorrhea and postgastrectomy osteomalacia.
Brit Med Journ 1: 1310 (1977)

104 Haddad, J.G., K.J. Chyu :
Competetive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol.
J Clin Endocrin 33: 992 (1971)

105 Taylor, C.M., S.E. Hughes, P. de Silva :
Competetive protein binding assay for 24,25-dihydroxycholecalciferol.
Biochem Biophys Res Commun 4: 1243 (1976)

106 Eisman, J.A., A.J. Hamstra, B.E. Kream, H.F. DeLuca :
A sensitive,precise and convenient method for determination of 1,25-dihydroxyvitamin D in human plasma.
Arch Biochem Biophys 176: 235 (1976)

107 Brumbaugh, P.W., D.H. Haussler, K.M. Bursac, M.R. Haussler :
Filter assay for 1α,25 dihydroxyvitamin D_3. Utilization of the hormone's target tissue chromatin receptor.
Biochemistry 13: 4091 (1974)

108 Lambert, P.W., D.O. Toft, S.F. Hodgson, E.A. Lindmark, B.J. Witrak, B.A. Roos :
An improved method for the measurement of $1,25\text{-}(OH)_2\ D_3$ in human plasma.
Endocr Res Commun 5 (4): 293 (1978)

109 Haussler, M.R., M.K. Drezner, J.W. Pike, J.S. Chandler, L.A. Hagan :
Assay of 1,25-dihydroxyvitamin D and other active vitamin D metabolites in serum: application to animals and humans.
In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds). Berlin, de Gruyter: 189 (1979)

110 Keck, E., H.L Krüskemper :
Protein binding assays for 25-hydroxy, 24,25-dihydroxy and 1,25-dihydroxy metabolites of vitamin D in human plasma.
J Clin Chem Clin Biochem 19: 1043 (1981)

111 Keck, E. :
Unveröffentlichte Ergebnisse.
Prof. Dr. Dr. Keck, Medizinische Klinik und Poliklinik C der Universität Düsseldorf, Moorenstr. 5, 4000 Düsseldorf

112 Schoen, M.S., J. Lindenbaum, M.S. Roginsky, P.R. Holt :
Significance of serum level of 25-hydroxycholecalciferol in gastrointestinal disease.
Digest Dis 23: 137 (1978)

113 Sitrin, M., S. Meredith, I.H. Rosenberg :
Vitamin D deficiency and bone disease in gastrointestinal disorders.
Arch Intern Med 138: 886 (1978)

114 Krawitt, E.L., E.B. Mawer, M. Davies :

Absorption of vitamin D and 25-OH vitamin D in patients with intestinal malabsorption. In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds). Berlin, de Gruyter: 975 (1979)

115 Arnaud, S.B., A.D. Newcomer, K.P. Offord, V.L.W. Go :
25-hydroxyvitamin D metabolism in nontropical sprue.
In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds). Berlin, de Gruyter: 975 (1979)

116 Morgan, D.B., C.R. Paterson, C.G. Woods, C.N. Pulvertaft, P. Forman :
Osteomalacia after gastrectomy.
Lancet 27:´1089 (1965)

117 Thompson, G.R., B. Lewis, C.C. Booth :
Vitamin D absorption after partial gastrectomy.
Lancet 26: 457 (1966)

118 Jung, R.T., M. Davie, P. Siklos, T.M. Chalmers, J.O. Hunter, D.E.M. Lawson :
Vitamin D metabolism in acute and chronic cholestasis.
Gut 20: 840 (1979)

119 Krawitt, E.L., M.J. Grundmann, E.B. Mawer :

Absorption,hydroxylation and excretion of vitamin D_3 in primary biliary cirrhosis.
Lancet 17: 1246 (1977)

120 Barragry, J.M., R.G. Long, M.W. France, M. R. Wills, B.J. Boucher, S. Sherlock :
Intestinal absorption of cholecalciferol in alcoholic liver disease and primary biliary cirrhosis.
Gut 20: 559 (1979)

121 Scott, J., E. Elias, P.J.A. Moult et al :
Rickets in adult cystic fibrosis with myopathy, pancreatic insuffiziency and proximal tubular dysfunction.
Am J Med 63: 488 (1977)

122 Long, R.G., R.K. Skinner, M.R. Wills, S. Sherlock :
Serum 25-hydroxyvitamin D in untreated parenchymal and cholestatic liver disease.
Lancet,2: 650 (1976)

123 West, T.B., E. Keck, W. Kohlsdorfer, H. Peerenboom :
Alterations in calcium, phosphate and vitamin D metabolism in gluten enteropathy (nontropical sprue) .
Acta Endocrin 102, Suppl. 253: 14 (1983)

124 Rosenstreich, S.J., C. Rich, W. Volwiler :
Deposition in and release of vitamin D_3 from body fat: evidence for a storage site in the rat.
J Clin Invest 50: 679 (1971)

125 Keck, E. :
Vitamin D. Beiträge zur Physiologie,Therapie und Meßmethodik. Stuttgart, Schattauer: 22 (1983)

126 DeLuca, H.F..:
Vitamin D metabolism and function.
Arch Intern Med 136: 836 (1978)

127 Schoen, M.S., J. Lindenbaum, M.S. Roginsky, P.R. Holt :
Significance of serum level of 25-hydroxycholecalciferol in gastrointestinal disease.
Am J Dig Dis 23: 137 (1978)

128 Dutta, S.K., M.P. Bustin, R.M. Russel, B.S. Costa :
Deficiency of fat-soluble vitamins in treated patients with pancreatic insufficiency.
Ann Intern Med 97: 549 (1974)

129 Stamp, T.C.B., J.M. Round :
Seasonal changes in human plasma levels of 25-hydroxyvitamin D.
Nature 247: 563 (1974)

130 Stryd, R.P., T.J. Gilbertson, M.N. Brunden :
A seasonal variation study of 25-hydroxyvitamin D_3 serum levels in normal humans.
J Clin Endocrin Metabol 48:(5): 771 (1979)

131 Hughes, M.R., D.J. Baylink, W.A. Gonnerman, S.U. Toverud, W.K. Ramp, M.R. Haussler :
Influence of dietary vitamin D_3 on the circulating concentration of its active metabolites

in the chick and rat.
Endocrinology 100: 799 (1977)

132 Tjelessen, L., C. Christiansen :
Seasonal variation of vitamin D metabolites in normal adults. A longitudinal study.
In: Vitamin D, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit (eds). Berlin, de Gruyter: 49 (1982)

133 Korkor, A., J. Schwartz, M. Bergfeld, S. Teitelbaum, L. Avioli, S. Klahr, E. Slatopolsky :
Absence of metabolic bone disease in adult patients with the nephrotic syndrome and normal renal function.
J Clin Endocrin Metab 56: 496 (1983)

134 Keck, E., B. Gollnick, D. Karch, D. Reinhardt, H. Peerenboom, H.L. Krüskemper :
Calcium metabolism and vitamin D metabolites in children receiving anticonvulsant drugs.
Eur J Pediatr 12: 1 (1982)

135 Eastwodd, J.B., H.E. de Wardener, R.W. Gray, J.L. Lemann jr. :
Normal plasma 1,25-$(OH)_2$-vitamin D concentrations in nutritional osteomalacia.
Lancet 1: 1377 (1979)

136 Tanaka, Y., H.F. DeLuca :
Stimulation of 24,25-dihydroxyvitamin D_3 production by 1,25-dihydroxyvitamin D_3.
Science 183: 1198 (1974)

137 Tanaka, Y., R.S. Lorenc, H.F. DeLuca :
The role of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and parathyroidhormone in the regulation of chick renal 25-hydroxyvitamin D_3-24-hydroxylase.
Arch Biochem Biophys 171: 521 (1975)

138 DeLuca, H.F. :
The vitamin D system: A view from the basic science to clinic.
Clin Biochem 14: 213 (1981)

139 Garabedian, M., M. Lieberherr, T.M. Nguyen :
In vitro production and activity of 24,25-dihydroxycholecalciferol in cartilage and calvarium.
Clin Orthop 135: 241 (1978)

140 Tanaka,Y., H.F. DeLuca :
Role of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in maintaining phosphorus and curing rickets.
Proc Nat Acad Sci USA 71: 1040 (1974)

141 Bordier, P., H. Rasmussen, P. Marie, L. Miravet, J. Gueris, A. Ryckwaert :
Vitamin D metabolites and bone mineralization in man.
J Clin Endocrin Metabol 46: 284 (1978)

142 Malluche, H.H., H. Henry, W.A. Meyer, D. Sherman, S.G. Masry, A.W. Norman :
Effects and interaction of 1,25-$(OH)_2$ D_3 and 24,25-$(OH)_2$ D_3 on bone.
In: Vitamin D, basic research and its clinical application, A.W. Norman, K. Schaefer, D.v.

Herrath, H.G. ,Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds). Berlin, de Gruyter: 425 (1979)

L E B E N S L A U F

Zur Person:	Werner Fett, geb. 26.12.1955 in Sacalaz / Rumänien ledig, römisch-katholisch
Eltern:	Eheleute Jakob und Margareta Fett geb. Pless
März 1961	Übersiedlung aus Rumänien in die BRD und Annahme der deutschen Staatsangehörigkeit

Ausbildungsgang:

1962 - 1966	Besuch der St.-Josef-Volksschule in Düren
1966 - 1974	Besuch des Stiftischen Gymnasiums in Düren
19.6.1974	Abitur am altsprachlichen Zweig des Stiftischen Gymnasiums, Düren
1.10.74 - 31.12.75	Ableistung des Grundwehrdienstes
März 76 - Okt 76	Tätigkeit als Aushilfskraft beim Arbeitsamt Düren

Studium der Humanmedizin:

1.10.76 - 19.5.83	Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf
August 1978	Physikum
August 1979	1. Staatsexamen

März 1982	2. Staatsexamen
19.4.82-19.3.83	Praktisches Jahr mit Wahlfach Psychiatrie im Akademischen Lehrkrankhaus Kempen und in der Rheinischen Landesklinik Düsseldorf-Grafenberg
7.4.1983 und 19.5.1983	3. Staatsexamen
4.7.1983	Erteilung der Approbation als Arzt

Düsseldorf, den 20.9.1983

Werner Fett